

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intellectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
8 de Abril de 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/029256 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 15/82

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2003/000009

(22) Fecha de presentación internacional:
15 de Septiembre de 2003 (15.09.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2002-0208
27 de Septiembre de 2002 (27.09.2002) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTEC-
NOLOGIA [CU/CU]; Departamento de Patentes, Ave. 31
entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, 10600 Ciudad de La
Habana (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): SELMAN-
HOUSEIN SOSA, Guillermo [CU/CU]; Calle 186 entre
31 y 33, No. 3115, Apto 6A. Cubanacán, Playa., 12100
Ciudad de la Habana (CU). AGUIAR CABEZA, Eduardo
[CU/CU]; Calle Fidel Claro, No.9, Agabama, Fomento,
64270 Sancti Spiritus (CU). GONZÁLEZ QUINTERO,
Annery, del Carimen [CU/CU]; Guairo No.13 entre Plá-
cido y San Miguel., 60200 Sancti Spíritus. (CU). RAMOS
GONZÁLEZ, Osmany [CU/CU]; Calle 170 entre 51 y 59,
No. 5137. Lisa., 13500 Ciudad de la Habana (CU).

(74) Mandatario: VAZQUEZ CASTILLO, Mariela; Ave. 31
entre 158 y 190, Cubanacán, Playa., 10600 Ciudad de La
Habana (CU).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea
concedida una patente (Regla 4.17(ii)) para las siguientes
designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)

- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv)) sólo para US

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: VECTOR FOR THE PRODUCTION OF TRANSPLASTOMIC ANGIOSPERM PLANTS

(54) Título: VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANGIOSPERMAS TRANSPLASTÓMICAS

(57) Abstract: The invention relates to a vector for the production of transplastomic angiosperm plants. More specifically, the invention relates to a DNA vector which enables the stable insertion and expression of heterologous genes in the genomes of cell plastids from any angiosperm plant. In the aforementioned vector, the genes to be introduced can be inserted in multiple cloning sites which are located in an artificial intergenic region which is obtained by combining the *rbcl* and *atpB* operons from plants of different groups (dicotyledons or monocotyledons). The expression cassette is integrated into the genome by means of recombination between the *rbcl* and *atpB* border sequences of the vector with the corresponding homologous regions of the plastid genome. More than one gene of interest can be expressed from the *rbcl* promoter adjacent to the border region which codes for the *atpB* gene.

(57) Resumen: Un vector de ADN que permite la inserción estable y la expresión de genes heterólogos en los genomas de plastidios de células de cualquier planta Angiosperma. En este vector los genes a introducir se pueden insertar en múltiples sitios de clonación localizados en una región intergénica artificial que se obtiene de combinar los operones *atpB* y *rbcl* pertenecientes a plantas de clases diferentes (dicotiledóneas o monocotiledóneas). El casete de expresión se integra al genoma mediante recombinación entre las secuencias bordes *atpB* y *rbcl* del vector, con las correspondientes regiones homólogas del genoma plastídico; pudiendo expresarse más de un gen de interés a partir del promotor *rbcl* adyacente a la región borde que codifica para el gen *atpB*

WO 2004/029256 A2



Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANGIOSPERMAS TRANSPLASTÓMICAS

Campo de la invención:

- 5 Esta invención se relaciona con la rama de la Biotecnología y más específicamente con la Ingeniería Genética de las Plantas. En particular, se proporcionan construcciones de ADN útiles para introducir con alta eficiencia y expresar genes foráneos en plastidios de plantas Angiospermas y se demuestra la utilidad de las mismas para obtener con alta eficiencia plantas transplastómicas que expresan proteínas heterólogas, en particular antígenos
10 vacunales y proteínas de uso farmacéutico.

Estado del arte:

- La ingeniería genética de las plantas es una tecnología que ha demostrado ser muy productiva para la investigación básica y la producción comercial de nuevos productos biotecnológicos (ver: Hammond J. Curr. Top. Microbiol. Immunol 1999, 240:1-19; Simoens C. y Van
15 Montagu M. Reproduction Update 1995, 1:523-542).

- Hasta hace pocos años, la producción de plantas transgénicas mediante el empleo del *Agrobacterium*, o por métodos directos de transformación se focalizaba en la inserción estable de los genes quiméricos introducidos en el núcleo de la célula vegetal (ver: Hansen G. y Chilton M.D. Curr. Top. Microbiol. Immunol 1999, 240:21-57; Newell C.A. Mol.
20 Biotechnol 2000, 16:53-65). Sin embargo, algunas limitaciones que presenta la transformación nuclear solo pueden ser eliminadas mediante la introducción selectiva de los nuevos genes en los organelos de la célula vegetal (ver: Bogorad L. Trends in Biotechnology 2000, 18:257-263; Heifetz P.B. Biochimie 2000, 82:655-666). En particular, la expresión de genes heterólogos en los plastidios presenta las siguientes ventajas con respecto a su
25 contraparte nuclear: 1) un nivel de expresión del transgen de 10 a 50 veces mayor que en el núcleo dado el alto número de copias de cada genoma por plastidio; 2) la inserción de los nuevos genes puede ser sitio específica por recombinación homóloga evitándose los efectos de posición, silenciamiento y otros fenómenos que influyen sobre la expresión de los genes introducidos al núcleo celular; 3) es posible la expresión de genes en operones, lo cual es
30 muy deseable cuando se trata de hacer ingeniería de las vías metabólicas o de alterar caracteres que son multigénicos; 4) la heredabilidad de la información genética es materna, por lo que se evita que mediante el polen se dispersen en el ambiente los nuevos caracteres introducidos, eliminándose así posibles daños al entorno. Adicionalmente, la expresión de genes en plastidios brinda la posibilidad de acumular allí proteínas heterólogas que en ese

microambiente pudieran tener una mayor estabilidad, o del cual pudieran ser más fácilmente purificadas.

Diferentes métodos se han reportado para la introducción de genes en plastidios de algas y plantas superiores. En particular, han sido muy empleados el bombardeo con micropartículas aceleradas recubiertas de ADN (Boynton J.E; Gillham E.H; Hosler J.P; y otros. Science 1988, 240:1534-1538; Daniell H; Vivekananda J; Nielsen B; y otros. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87:88-92; Svab Z; Hajdukiewicz P; Maliga P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87:8526-8530), y en menor escala la transformación de protoplastos vegetales mediante PEG (O'Neill C; Horvath G.V; Horvath E; y otros. Plant J 1993, 3:729-738; Golds T; Maliga P; Koop H-U. Biotechnology 1993, 11:95-97), y la microinyección (Knoblauch M; Hibberd J.M; Gray J.C; van Bel A.J.E. Nature Biotechnol 1999, 17:906-909).

La inserción estable en el genoma plastídico de las secuencias de ADN introducidas, se ha logrado mayoritariamente utilizando los eficientes mecanismos de recombinación homóloga que naturalmente existen en estos organelos celulares (Blowers A.D; Bogorad L; Shark K.B.; Sanford J.C. Plant Cell 1989, 1:123-132; Staub J.M. y Maliga P. Plant Cell 1992, 4:39-45; Kavanagh T.A; Thanh N.D; Lao N.T; y otros. Genetics 1999, 152:1111-1122). Es de destacar que cuanto mayores sean las regiones homólogas, con más alta frecuencia ocurrirán los eventos de recombinación, siendo estos despreciables cuando las regiones homólogas son menores de 137pb (Zoubenko O.V; Allison L.A; Svab Z; Maliga P. Nucleic Acid Res 1994, 22:3819-3824).

Muchas regiones han sido propuestas como sitios adecuados de recombinación para insertar secuencias quiméricas en plastidios vegetales, entre ellas: rbcL-accD, psbE-petA, trnV-rps7/12, trnV-16SrRNA operon, psbA-trnH, trnA-trnI, la región 23SrRNA, etc (Svab Z. y Maliga P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90:913-917; Zoubenko O.V; Allison L.A; Svab Z; Maliga P. Nucleic Acid Res 1994, 22:3819-3824; Daniell H; Datta R; Varma S; y otros. Nature Biotechnol 1998, 16:345-348; US Pat. 5,877,402; WO 9910513). A pesar de que algunas de estas regiones se recomiendan como universales para la integración de secuencias foráneas de ADN en los genomas de plastidios vegetales de diferentes especies de plantas, en realidad presentan algunas limitaciones en cuanto a su universalidad debido a una o más de las siguientes razones: 1) sus secuencias y/o estructuras no son altamente conservadas entre los genomas plastídicos de plantas de especies diferentes; 2) poseen regiones de alta homología muy pequeñas seguidas de, o interrumpidas por, intrones u otras regiones mucho menos conservadas (lo que disminuye la frecuencia de recombinación homóloga y por ende de obtención de plantas con plastidios transgénicos (transplastómicas)); 3) se encuentran

formando parte de operones naturales de los plastidios, por lo que una alteración dentro de estas estructuras puede afectar las tasas salvajes de transcripción para cada gen del operon o el correcto procesamiento de los RNA policistrónicos (Ohme M; Kamogashira T; Shinozaki K; Sugiura M. *Nucleic Acid Res* 1985, **13**:1045-1056), con las indeseables consecuencias que esto acarrea para el metabolismo del plastidio. De hecho, no es casual que utilizando vectores portadores de las regiones antes mencionadas como sitios de recombinación, solo se han reportado adecuadamente documentadas en publicaciones arbitradas producciones de plantas transplastómicas de tabaco (Svab Z. y Maliga P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**:913-917), papa (Sidorov V.A; Kasten D; Pang S.Z; y otros. *Plant J* 1999, **19**:209-216) y tomate (Ruf S; Hermann M; Berger I.J; y otros. *Nature Biotechnol* 2001, **19**:870-875), todas especies Solanaceas muy cercanas evolutivamente y a nivel de estructura primaria del ADN. Adicionalmente, es de destacar que todos los vectores propuestos que utilizan estas regiones de recombinación muestran una baja eficiencia de producción de plantas transplastómicas homoplásmicas (plantas con todos sus genomas plastídicos homogéneamente transformados). Esto último se debe probablemente a que incluyen el uso de regiones terminadoras y promotores de origen plastídicos mayores de 174 pb (Iamtham S. y Day A. *Nature Biotechnol* 2000, **18**:1172-1176), lo que provoca que muchos eventos de transformación se malogren por recombinaciones entre estos elementos del vector y regiones homólogas del genoma plastídico dando lugar a plastidios no viables (Svab Z. y Maliga P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**:913-917; Kanevski I; Maliga P; Rhoades D.F; Gutteridge S. *Plant Physiol* 1999, **119**:133-141).

La región del genoma plastídico más universalmente conservada en cuanto a estructura y secuencia nucleotídica entre las plantas Angiospermas, es la compuesta por los operones que se transcriben en direcciones opuestas *atpB* y *rbcL*. De hecho, estos genes contienen segmentos de ADN mayores de 1500 pares de bases (pb) con homologías superiores al 85% entre plastidios de plantas pertenecientes a clases diferentes (dicotiledóneas o monocotiledóneas) y más del 91% de homología nucleotídica al analizar plantas de la misma clase (ver Tabla 1). Por otra parte, la región intergénica entre estos dos operones presenta una homología a nivel nucleotídico muy baja (menos del 50%) entre los plastidios de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Tabla 1. Homología a nivel nucleotídico entre los genes *rbcL* y *atpB* de plantas de diferentes especies y clases.

	Maíz	Tabaco	Arroz	Espinaca	
Maíz		86.0 %	95.5 %	86.2 %	atpB
Tabaco	86.1 %		86.6 %	91.8 %	
Arroz	95.1%	86.7%		87.0 %	
Espinaca	86.2%	91.1%	85.8%		
	rbcL				

- 5 La subunidad mayor de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) está codificada por el gen plastídico *rbcL*. Experimentalmente se ha determinado que la región carboxilo-terminal de la *rbcL* forma la alfa-hélice número 8 de esta proteína, y que esta región está involucrada en la interacción con la subunidad menor de esta enzima, codificada por el gen nuclear *rbcS* (Knight S; Andersson I; Branden C-I. J. Mol. Biol. 1990, 215:113-160; Curmi P.M.G; Cascio D; Sweet R.M; y otros. J. Biol. Chem. 1992, 267:16980-16989).
 10 A partir de estos y otros datos (Kanevski I; Maliga P; Rhoades D.F; Gutteridge S. Plant Physiol. 1999, 119:133-141), y considerando el menor grado de conservación entre las regiones C-terminal de proteínas *rbcL* de plastidios pertenecientes a especies de plantas diferentes, se plantea la hipótesis de que la alfa-hélice 8 de la *rbcL* define la especie
 15 especificidad de las interacciones entre las dos subunidades que forman la Rubisco.

Se ha demostrado que posiblemente gracias a una estructura tipo lazo que se encuentra cercana al inicio de transcripción del promotor *rbcL* (posición +1 a +26 a partir del inicio de transcripción), los RNA por él producidos se estabilizan, compensando con esto la disminución de la actividad transcripcional de este promotor durante la oscuridad (Shiina T; Allison L; Maliga P. The Plant Cell 1998, 10:1713-1722). Igualmente, varios segmentos de
 20 secuencias posicionados cerca o dentro de la región estructural de este promotor se asemejan a secuencias de factores de unión a ADN de cloroplastos (CDF), y pudieran tener un papel importante en la regulación transcripcional de este promotor.

Algunas particularidades que caracterizan la transcripción/traducción del operon *atpB-atpE* (codificante para las sub-unidades β y ϵ de la ATP-sintasa de cloroplastos) han sido
 25 reportadas (Shinozaki K; Deno H; Kato A; Sugiura M. Gene 1983, 24:147-155; Gatenby A.A; Rothstein S.; Nomura M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:4066-4070; Kapoor S;

Wakasugi T; Deno H; Sugiura M. Curr. Genet. 1994, 26:263-268). Estos dos genes están solapados, y en particular llaman la atención las características traduccionales de atpE basadas en un corrimiento del marco abierto de lectura, y una región conservada dentro de la región codificante para atpB que contiene un posible promotor de atpE (posiciones +1027 a +1064 de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína atpB de arroz, tabaco, etc.). La funcionalidad de este promotor *in vivo* no esta totalmente demostrada, pero no se descarta que juegue algún papel en la regulación transcripcional de atpE.

El posible uso de la región intergénica atpB-rbcL como blanco para la inserción de genes foráneos en plastidios se describe únicamente por Cannon M.C. y Cannon F.C en la solicitud de patente europea No. 0 251 654. Sin embargo, esta patente propone el uso de un transposon bacteriano como vehículo para introducir genes foráneos en la región intergénica de estos dos operones divergentemente transcribibles. No es casual que Cannon M.C. y Cannon F.C. no reportaran la obtención de plantas transplastómicas, ya que la inserción de un transposon en esta región intergénica no solo interrumpe la reportada interacción entre los promotores atpB y rbcL (Hanley-Bowdoin L. y Chua N-H. Mol. Gen. Genet. 1989, 215:217-224), sino que además (como es el caso del maíz y arroz por ejemplo) interrumpe la transcripción del gen atpB a partir del promotor NEP (promotor dependiente de polimerasa nuclear) que se encuentra dentro de la región 5' no traducible del gen rbcL (Welhe A. y Börner T. Trends in Plant Science 1999, 4:169-170). Es evidente que una correcta transcripción y regulación de la expresión de los productos codificados por estos operones son absolutamente necesarios para el adecuado funcionamiento y viabilidad de los plastidios. Adicionalmente, el vector de expresión descrito por Cannon M.C. y Cannon F.C. no contiene terminadores de la transcripción, un elemento indispensable para la expresión génica en plastidios (Stern D.B. y Kindle K.L. Mol. Cell Biol. 1993, 13:2277-2285; Chen H.C. y Stern D.B. Mol Cell Biol. 1991, 11:4380-4388).

Además de regiones terminadoras de la transcripción, de las cuales también se pueden emplear exitosamente aquellas de origen bacteriano (Chen L.J. y Orozco E.M. Jr. Nucleic Acid Res. 1988, 16:8411-8431), es necesario que los genes introducidos a los plastidios se encuentren bajo promotores funcionales en los mismos. Entre los promotores más empleados para expresar genes en plastidios transgénicos se encuentran los promotores fuertes Prn del ARNr 16S (Svab Z. y Maliga P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90:913-917) y el PsbA (Daniell H. Methods in Molecular Biology 1997, 62:463-489). El promotor Prn es constitutivo, mientras que la transcripción/traducción de los ARN producidos por el promotor PsbA es inducida por la luz y depende de su región 5' no traducible. La delección de la región

5' no traducible del gen *psbA* hace independiente de la luz la expresión de su ARNm, sin embargo la traducción del mismo se ve afectada (Staub J.M. y Maliga P. Plant J. 1994, 6:547-553; Eibi C; Zou Z; Beck A; y otros. Plant J. 1999, 19:333-345). Estos promotores tienen secuencias -35 y -10 homólogas a los consensos descritos para los promotores bacterianos y se transcriben dependiente de una polimerasa codificada por el genoma

5 plastídico (PEP) (Hess W. y Börner T. Int. Rev. Cytol. 1999, 190:1-59).

Entre otras similitudes entre los mecanismos de transcripción/traducción de plastidios y bacterias, también se ha demostrado que ARNm policistrónicos pueden ser expresados y eficientemente traducidos en plastidios de tabaco (Staub J.M. y Maliga P. Plant J. 1995, 7:845-848); siendo funcionales en cloroplastos las regiones de unión a ribosomas (RBS) que contienen secuencias tipo Shine-Dalgarno (Stern D.B; Higgs D.C; Yang J. Trends Plant Sci. 1997, 2:308-315).

10

Para facilitar la selección de las plantas transplastómicas, se ha propuesto entre otras variantes el uso de marcadores de selección positiva como por ejemplo: la kanamicina (Daniell H. Methods in Molecular Biology 1997, 62:463-489), o el más universalmente

15 utilizado la espectinomycin (Svab Z; Hajdukiewicz P; Maliga P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87:8526-8530; Svab Z. y Maliga P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90:913-917); para lo cual el gen que confiere resistencia al compuesto de selección se clona en el vector de transformación bajo señales apropiadas para su correcta expresión en los plastidios.

A tono con la conservación de la naturaleza, se han elaborado tecnologías llamadas "limpias" que permiten eliminar de las plantas que se liberan al medio ambiente los genes que codifican para los marcadores de selección. Dos de estas metodologías aplicadas exitosamente en la producción de plantas transplastómicas son: la co-transformación con dos vectores y posterior segregación y eliminación de los individuos que portan el marcador de selección

20 (Fisher N; Stampacchia O; Redding K; Rochaix J.D. Mol. Gen. Genet. 1996, 251:373-380) y la inserción del gen marcador entre dos secuencias repetidas en el casete de expresión para la posterior eliminación de este gen por recombinación homóloga durante el cultivo en medios no selectivos (Fisher N; Stampacchia O; Redding K; Rochaix J.D. Mol. Gen. Genet. 1996, 251:373-380; Iamtham S. y Day A. Nature Biotechnol. 2000, 18:1172-1176).

30 Descripción detallada de la invención:

El vector para la transformación estable y expresión de genes heterólogos en plastidios de plantas Angiospermas que propone la presente invención, contiene un grupo de características propias que lo distinguen: 1) no se emplea un transposón para insertar fragmentos de ADN en el genoma plastídico; 2) las regiones bordes *atpB* y *rbcL* pertenecen a

plantas Angiospermas de clases diferentes formando una región intergénica artificial; 3) sitios múltiples de clonación en la región intergénica artificial transcripcionalmente inactiva, permiten la inserción de uno o más genes heterólogos sin afectar la correcta transcripción, procesamiento de los ARNm y expresión de los genes *atpB* y *rbcL*; 4) el diseño de nuestro vector permite la expresión de los genes introducidos sin necesidad de que porten secuencias promotoras o terminadoras, siempre y cuando las secuencias codificantes para proteínas estén precedidas por un sitio de unión a ribosomas (esto contribuye a disminuir eventos indeseables de recombinación y a un ahorro de recursos metabólicos de los plastidios, permitiendo una mayor estabilidad del fragmento de ADN heterólogo y un aumento de la frecuencia de producción de plantas homoplásmicas); 5) la estructura y secuencias de las regiones bordes que propone nuestra invención garantizan la universalidad del presente vector. Además, el vector que proporcionamos constituye una herramienta “limpia” para la introducción de genes en las plantas cultivables por cuanto su diseño permite que se elimine el marcador de selección, por recombinación homóloga entre secuencias repetidas, una vez que se han logrado las plantas transplastómicas homoplásmicas.

El diseño y la extensión de la región *atpB-rbcL*, con su región intergénica artificial, constituye la base del presente objeto de invención pues nos permite insertar de forma eficiente y estable genes y operones en el genoma de los plastidios de plantas Angiospermas de cualquier especie, sin provocarles ninguna alteración funcional.

Al diseñar la región intergénica artificial hubo que resolver el reto que representa el poder introducir en la misma un gen foráneo, sin afectar la interacción entre los promotores *rbcL* y *atpB*, y las tasas de transcripción natural de los mismos.

Por otra parte, hubo que considerar que los productos de los genes *atpB* y *rbcL* constituyen subunidades de enzimas que realizan funciones vitales para el mantenimiento de los plastidios y las plantas. Esta última situación impone limitaciones en cuanto a la longitud de los fragmentos seleccionados como bordes para la recombinación, por cuanto es de esperar que determinados dominios de estas proteínas estén involucrados en las interacciones proteína-proteína y pueden determinar el reconocimiento entre las diferentes subunidades de estas enzimas y su correcto plegamiento y funcionalidad.

Al utilizar la región *atpB-rbcL* como sitio de recombinación para la inserción de genes foráneos en los plastidios de plantas de especies diferentes, hay que considerar que se producirán proteínas híbridas, y por tanto merece especial atención lo planteado en el párrafo anterior. De esta forma, para evitar afectaciones en el correcto ensamblaje y funcionalidad de una Rubisco híbrida, postulamos que es necesario mantener invariable en el producto de la

recombinación la región del gen *rbcL* que codifica para la alfa-hélice 8. Así, durante el diseño del vector objeto de esta invención decidimos que el fragmento de ADN para la transformación de plastidios mediante recombinación homóloga, que incluye parte de la secuencia traducible del gen *rbcL* (en lo adelante llamado **borde-*rbcL***), debía extenderse solo hasta la región amino-terminal de la alfa-hélice 8, y más específicamente hasta un triptofano (Trp-411) altamente conservado en esa posición en todas las *rbcL*s de las plantas Angiospermas.

Con relación a la región que codifica para el gen *atpB*, no se detecta ningún dominio con marcada variabilidad al comparar las secuencias de proteínas provenientes de plastidios de plantas de diferentes especies. Sin embargo, fueron tenidas en cuenta las particularidades transcripcionales/traduccionales del operon *atpB-atpE* al elegir el fragmento de ADN, que incluye parte de la secuencia traducible del gen *atpB* (en lo adelante llamado **borde-*atpB***), para la integración de genes foráneos a plastidios mediante recombinación homóloga.

En nuestro diseño de la región intergénica artificial que nos permita insertar nuevos genes sin afectar la transcripción de *atpB* y *rbcL*, nos aprovechamos de la baja homología a nivel nucleotídico que muestra la región entre estos operones cuando comparamos secuencias de plastidios pertenecientes a plantas Angiospermas de clases diferentes.

En la construcción genética objeto de esta invención, el **borde-*rbcL*** debe comprender un fragmento de ADN que porta parte del gen y toda su región 5' regulatoria no transcribible.

Este fragmento incluye: 1) el promotor PEP (dependiente de polimerasa codificada por el plastidio) de *rbcL* con las secuencias CDF asociadas a él; 2) la región 5' no traducible del gen *rbcL* y 3) la secuencia codificante para *rbcL* hasta la región que se corresponde con el N-terminal de la alfa-hélice 8. Así, el **borde-*rbcL*** en el vector objeto de esta invención va a extenderse desde la posición -291 de la secuencia nucleotídica que codifica para esta proteína en tabaco, hasta la posición +1233 (Trp-411 en la secuencia aminoacídica) a partir del codón de inicio de traducción de este gen.

Es de destacar que al intentar clonar la región **borde-*rbcL***, descubrimos que la expresión del gen *rbcL* a partir de su propio promotor es tóxica a la *E. coli*; por lo que fue necesario sustituir un fragmento poco conservado de la región 5' no traducible de este gen por un operador *lac* "ideal" (Simons A. y otros. 1984) y además, clonar este **borde** quimérico en un vector plasmídico de bajo número de copias (pBR322) que será propagado en una cepa bacteriana super-productora del represor *lacI* como por ejemplo XL1-Blue, JM101, etc.

En la construcción genética que proponemos se decidió tomar como el **borde-*atpB*** un fragmento de ADN que incluye: 1) el promotor *rbcL* adyacente y las secuencias tipo lazo

cercanas al inicio de transcripción que estabilizan los transcritos producidos por este promotor; 2) los promotores de *atpB* incluyendo su promotor NEP; 3) la región 5' no traducible del gen *atpB* y 4) la secuencia codificante para *atpB* hasta unos 300 pb antes del codon de parada del este gen. De esta forma, al diseñar el vector objeto de esta invención el

5 borde-*atpB* se extiende desde la posición -654 de la secuencia nucleotídica que codifica para esta proteína en arroz, hasta la posición +1211 a partir del codón de inicio de traducción de este gen.

El promotor *rbcL* que contiene el borde-*atpB*, permite que a partir de él se pueda expresar con estabilidad un gen de interés en dirección contraria a la transcripción de *atpB-atpE*. Por

10 conveniencia, bajo este promotor pudiera clonarse un casete genético conteniendo uno o más genes foráneos bajo un promotor funcional en plastidios, y de esta manera obtendríamos la expresión de ellos potenciada por la transcripción a partir de dos promotores en tándem.

Al introducir en un plásmido las regiones bordes anteriormente descritas, para su mantenimiento y multiplicación en *E. coli*, se clonan una a continuación de la otra separadas

15 por un segmento de ADN que contiene sitios de clonación (MCS1, ver Figura 1-A) útiles para la inserción de los genes heterólogos que se pretendan introducir posteriormente al genoma de los plastidios. Con esta estructura, en que las direcciones de la transcripción de los genes *atpB* y *rbcL* van a ser divergentes, y debido a que la región promotora *rbcL* está duplicada, se obtienen dos fragmentos de ADN repetidos y en la misma dirección bordeando

20 la región que contiene los sitios de clonación; sin embargo, debido a la baja homología existente en esta región intergénica entre genomas plastídicos de Angiospermas de clases diferentes, no ocurre ningún evento de recombinación homóloga ya que solo un fragmento de aproximadamente 90 pb presenta un alto grado de homología.

La construcción anteriormente descrita es la base del vector objeto de esta invención, donde

25 además se introducirá en el MCS1, en dirección 5'-3' a partir del promotor *rbcL* del borde-*atpB*, un gen que codifique para un marcador que permita la selección positiva de las células transformadas, bordeado por secuencias de ADN repetidas que facilitarán mediante recombinación homóloga la eliminación del marcador una vez obtenidas las plantas transplastómicas homoplásmicas, si esto fuera deseado. La terminación de la transcripción

30 del gen marcador, o de cualquier otro gen que se inserte en el MCS1, estará dada por un terminador bacteriano que se coloca adyacente al extremo 5' del borde-*rbcL* (preferiblemente el terminador bidireccional *rrnBT1T2* del operon *rrnB* de *E. coli* (Brosius J; Dull T.J; Sleeter D.D; Noller H.F. J. Mol. Biol. 1981, 148:107-127) evitando que la actividad transcripcional

del fragmento insertado interfiera el normal funcionamiento del promotor natural de este borde.

De esta forma, la estructura general del vector objeto de esta invención se muestra en la Figura 1-B, donde el gen, o los genes, de interés se pueden clonar bajo el promotor *rbcL* del borde-*atpB* formando una unidad transcripcional mono o policistónica (Figura 1-C), o bajo
5 otros promotores funcionales en plastidios pudiéndose obtener por ejemplo una unidad policistónica bajo dos promotores en tandem (Figura 1-D), o dos unidades transcripcionales independientes bajo diferentes combinaciones de regiones promotoras (Figuras 1-E y Figura 1-F).

10 Para facilitar la selección de las plantas transplastómicas, nosotros decidimos usar como marcador de selección la higromicina, ya que a pesar de que este antibiótico es extremadamente tóxico a plantas dicotiledóneas como el tabaco, y por lo tanto debe ser empleado con moderación, resulta mucho más efectivo como agente selectivo para la obtención de plantas monocotiledóneas con plastidios modificados genéticamente. Por esto,
15 el gen *hgh* que codifica para la resistencia a la higromicina-B en *Klebsiella* (Gritz L. y Davies J. Gene 1983, 25:179-188), conteniendo una región Shine-Dalgarno adecuada, es clonado en el MCS1 bajo el promotor *rbcL* del borde-*atpB* (Figura 1-B).

A fin de ofrecer una herramienta ecológica, en el vector objeto de esta invención el gen marcador fue introducido bordeado por dos secuencias de ADN repetidas que permiten su
20 eliminación mediante recombinación homóloga (Figura 1-B), una vez que ya obtenidas las plantas transplastómicas se elimina el agente selectivo del medio de cultivo. Las secuencias repetidas que empleamos en nuestra construcción son provenientes de la región que codifica para la proteína s10 del fago T7 (Dunn J.J. y Studier F.W. J. Mol. Biol. 1983, 166:477-535). Nuestros vectores tienen la particularidad de que al eliminar solo el gen marcador, se
25 mantienen inalterables el resto de las secuencias regulatorias de su operon (Figuras 1-C, 1-D, 1-E y 1-F); así, cualquier gen transcripcionalmente fusionado al gen marcador continuará inalterable su expresión, economizándose los recursos del vector. Esta arquitectura es otra de las cualidades que distinguen al vector objeto de esta invención de otros sistemas descritos como vehículos para la modificación genética de plastidios.

30 Es obvio que otros genes que confieran resistencia a antibióticos como a la espectinomicina (Chinault A.C; Blaskley V.A; Roessler E; Willis D.G; y otros. Plasmid 1986, 15:119-131), o a las sulfonamidas (Guerineau F; Mullineaux P. Nucleic Acid Res 1989, 17:4370), podrían ser también utilizados para facilitar la selección de las plantas transplastómicas. De la misma forma, genes que confieran resistencia a compuestos herbicidas como el glifosato (Shah D.M;



Horsch R.B; Klee H.J; Kishore G.M; y otros. Science 1986, 233:478-481; Comai L; Facciotti D; Hiatt W.R; Thompson G; y otros. Nature 317:741-744), el glufosinato (DeBlock M; Botterman J; Vandewiele M; Dockx J; y otros. EMBO Journal 1987, 6:2513-2518), asulam (Guerineau F; Brooks L; Meadows J; Lucy A; y otros. Plant Mol Biol 1990, 15:127-136),
 5 bromoxinil (Stalker D.M. y McBride K.E. J. Bacteriol 1987, 169:955-960), sulfonilureas y imidazolinonas (LaRossa R.A y Smulky D.R. J. Bacteriol 1984, 160:391-394), etc, pueden ser clonados en la región intergénica artificial y empleados como marcadores de selección con la ventaja adicional de que este es un carácter agronómico deseable.

Para alguien con experiencia en el estado del arte y las técnicas de la ingeniería genética, es
 10 obvio que lo aquí descrito permite utilizar como regiones bordes para la integración de genes en el genoma de plastidios de plantas Angiospermas, cualquier combinación de las regiones atpB y rbcL, con todas o parte de las características descritas, siempre y cuando su fuente sean plastidios de plantas pertenecientes a Angiospermas de clases diferentes (monocotiledóneas o dicotiledóneas). Igualmente, múltiples genes, marcadores de selección y
 15 combinaciones de cistrones y operones son posibles de clonar en el MCS1 de la región intergénica artificial del vector que aquí se propone (Figura 1-A), a fin de insertarlos establemente y expresarlos en plastidios de cualquier planta Angiosperma.

Depósito de microorganismos

Los plásmidos pVTPA-HB-aadA, pVTPA-f-GUS, pVIEP fueron depositados bajo las
 20 reglamentaciones del Tratado de Budapest para el depósito de microorganismos en el *Belgian Coordinated collection of Microorganisms BCCM, LMBP-COLLECTION* con los números de acceso LMBP 4635, LMBP 4636 y LMBP 4637 respectivamente, depositados el 24 de Septiembre, 2002.

Descripción de las Figuras:

25 Figura 1. A, estructura base para la construcción del vector objeto de la presente invención mostrando la región que contiene sitios para la clonación (MCS1) acotada por:
 el borde-atpB  y el borde-rbcL  pertenecientes a Angiospermas de clases diferentes (monocotiledóneas ó dicotiledóneas).

B, estructura general del vector objeto de la presente invención (rbcLpr- promotor
 30 del gen *rbcL*, atpBpr- promotor del gen *atpB*, Term- terminador de la transcripción de origen no plastídico, Marcador- gen marcador de selección, R1, R2- secuencias repetidas que permiten eliminar el gen marcador por recombinación homóloga).

C, D, E, F, variantes del vector objeto de la presente invención mostrando las posibilidades de expresar uno o más genes de interés (gen, gen1, gen2) como unidades

monocistrónicas (E, F) bicistrónicas (C, E, F) o tricistrónicas (D), bajo uno (C, E, F) o más (D, F) promotores funcionales en plastidios (Pr, Pr1, Pr2).

Figura 2. Mapa del vector para transformación de plastidios de plantas Angiospermas pVTPA-f.

5 Figura 3. Mapa del vector para transformación de plastidios de plantas Angiospermas pVTPA.

Figura 4. Mapa del vector intermediario para la expresión de genes en plastidios pVIEP. (S/D- secuencia Shine-Dalgarno).

Figura 5. Southern blot de 10 µg de ADN de cloroplastos purificados por gradiente de sacarosa, digerido con Pst I y empleando como sonda marcada con ³²P el fragmento 5' del gen *rbcL*. Carril-1: planta no transformada; carriles-2 al 6: plantas transformadas (se puede apreciar que todas son homoplásmicas); carriles 7 y 8, plantas transformadas crecidas en ausencia del agente de selección durante el último ciclo de cultivo *in vitro* (notar que en la primera de ellas aún no ha ocurrido la total eliminación del gen marcador por
10 recombinación).
15

Figura 6. Demostración mediante Western blot del uso de nuestros vectores de transformación para la expresión del antígeno de superficie de la hepatitis B en cloroplastos. 10 µg de proteínas totales de hojas fueron analizados en cada corrida. Carril-1: planta no transformada; carriles 2-5: plantas transplastómicas que expresan el HBsAg (obsérvese la
20 señal revelada por el anticuerpo contra el virus de la hepatitis B a la altura esperada de aproximadamente 25 KDa).

Figura 7. Demostración mediante Western blot del uso de nuestros vectores de transformación para la expresión en plastidios de las cadenas proteicas que conforman un anticuerpo monoclonal. 10 µg de proteínas totales de hojas fueron analizados en cada corrida.
25 Carril-1: planta no transformada; carriles 2-5: plantas transplastómicas que expresan el anticuerpo recombinante CB-Hep.1 (obsérvese las señales correspondientes a las cadenas pesada (50 KDa) y ligera (25 KDa) de la inmunoglobulina).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN:

30 Ejemplo No.1: Construcción de vectores para la transformación estable y expresión de genes heterólogos en plastidios de plantas Angiospermas.

a) Obtención del borde-*rbcL*.

El fragmento borde-rbcL fue construido de la siguiente forma: utilizando los oligonucleótidos descritos en las secuencias No.1 y No.2 se amplificó un fragmento de ADN de 1524 pb correspondiente al gen que codifica para la RBCL de tabaco mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el PCR se empleó ADN purificado de cloroplastos de hojas de N. tabacum var. SR1. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pBluescript II SK (Stratagene, USA), previamente digerido con las enzimas de restricción EcoRV y SpeI/Klenow, obteniendo los clones pBSrbcL. Varios de los clones positivos fueron sometidos a secuenciación automática de ADN, y se demostró que a pesar de emplear una polimerasa de alta fidelidad al realizar los PCR (Pfu ADN Polimerasa, Promega, USA) todos los clones presentaban mutaciones. Este hecho, más otras evidencias no concernientes a la presente invención, nos indicó que la RBCL de tabaco estaba siendo tóxica a la *E.coli* al expresarse a partir de su propio promotor; por esta razón, decidimos mutagenizar un fragmento poco conservado de la región 5' no traducible del gen *rbcL* a fin de crear allí un operador lac "ideal" que nos permitiera clonar este fragmento borde en cepas de *E.coli* lacI⁺. Para realizar la mutagénesis, el clon pBSrbcL13 (que contiene una mutación en el fragmento SacII-BamHI del gen *rbcL*) fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y EcoRI, que cortan la secuencia de *rbcL* en las posiciones -162 y -29, y se sustituyó este fragmento del gen *rbcL* por un fragmento de ADN sintético con la región -124 a -97 alterada de forma tal que formara un sitio de unión "ideal" del represor lac (Secuencia No.3).

Una vez insertado el operador lac en el clon pBSrbcL13 (llamado ahora pBSrbcL13lacOp), escindimos el fragmento rbcL mediante restricción con las enzimas SalI y XbaI/Klenow, y lo clonamos en el vector de bajo número de copias pBR322 (New England Biolabs, USA) digerido con las enzimas SalI y EcoRV (el sitio XbaI se restituye), para obtener el plásmido pBR322rbcL13lacOp, en el cual el gen *rbcL* se transcribe en dirección SalI -XbaI.

A continuación, la mutación presente en el clon rbcL13 fue eliminada sustituyendo el fragmento SacII-BamHI del pBR322rbcL13lacOp por un fragmento SacII-BamHI libre de mutaciones obtenido de otro clon pBSrbcL secuenciado. De esta forma obtenemos el plasmidio pBR322rbcLOK, conteniendo el borde-rbcL (Secuencia No.4).

b) Obtención del borde-atpB.

El fragmento borde-atpB fue construido de la siguiente forma: utilizando los oligonucleótidos descritos en las secuencias No.5 y No.6, se amplificó un fragmento de ADN de 1754 pb correspondiente al gen que codifica para la ATPB de arroz mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el PCR se empleó ADN purificado de cloroplastos de hojas de Oriza sativa var. IAC-18. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pBluescript

II KS (Stratagene, USA), previamente digerido con la enzima de restricción HincII, (hacia la región 5' del fragmento clonado se restituye el sitio HincII(SalI)) obteniendo los clones pBSatpB. Varios de los clones positivos fueron sometidos a secuenciación automática de ADN, seleccionándose un clon totalmente correcto.

- 5 Mediante digestión HindIII-SalI (se restituye la secuencia original y se pierde el sitio SalI) y ligazón, se adicionó a la región 5' del clon seleccionado de *atpB*, un fragmento sintético de ADN que porta sitios de restricción adicionales y parte de la región 5' no traducible del gen *atpB* de arroz que contiene el promotor NEP (secuencia No.7), dando lugar al plasmidio pBSatpB completo. En este vector el gen *atpB* se transcribe en dirección HindIII-XhoI. La
- 10 secuencia nucleotídica del borde-*atpB* construido se muestra en la secuencia No.8.

c) Obtención del casete de selección con bordes repetidos.

- El fragmento de ADN de aproximadamente 1Kb que contiene el gen que codifica para la resistencia a higromicina (*hgh*) fue obtenido a partir del plasmidio pBSBar, mediante amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos descritos en las secuencias No.9 y
- 15 No.10, que incorporan una región tipo Shine-Dalgarno 7 pb antes del inicio de traducción y sitios de restricción para facilitar la manipulación de este fragmento. El ADN amplificado fue digerido con KpnI y clonado en el vector pUC19 previamente digerido con SmaI (el sitio SmaI se conserva después de la ligazón) y KpnI, para dar lugar al plasmidio pUC19Hyg. A continuación, después de digerir el plasmidio obtenido con HindIII y SmaI, se introdujo un
- 20 fragmento de ADN sintético conteniendo sitios de restricción que nos serán de utilidad para las manipulaciones genéticas y clonajes posteriores (secuencia No.11); el vector así obtenido fue nombrado pUC19-linker-Hyg.

- El fragmento de ADN que fungirá como la región repetida que por recombinación homóloga permitirá eliminar el gen marcador una vez obtenidas las plantas transplastómicas, fue
- 25 obtenido de un fragmento de ADN que codifica para la proteína s10 del fago T7 presente en el vector de expresión pET3xb (Novagen, USA). El vector pET3xb fue inicialmente digerido con BamHI-NdeI, y el fragmento de 780pb obtenido fue re-digerido con TaqI/Klenow y KpnI de forma tal que se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 310pb que clonamos en el vector pUC19 previamente digerido con SmaI y KpnI, para obtener el plasmidio pUC-
- 30 Spacer.

El fragmento del gen s10 clonado en el pUC-Spacer fue escindido mediante digestión con XbaI/Klenow y KpnI e introducido hacia el 3' del gen *hgh* en el vector pUC19-linker-Hyg digerido con EcoRI/Klenow y KpnI, para obtener el plasmidio pUC19-linker-Hyg-spacer.

El segundo borde repetido clonado 5' al gen *hgh* se introdujo obteniendo el spacer mediante digestión del pUC-Spacer con EcoRI/Klenow y BamHI, e insertándolo en el pUC19-linker-Hyg-spacer previamente digerido con SmaI y BglII, obteniendo el plasmidio pUC-linker-spacer-Hyg-spacer.

- 5 El terminador bidireccional *rrnBT1T2* de *E.coli* se obtuvo mediante digestión con BspHI/Mung bean nuclease y HindIII del vector pTrcHisB (Invitrogen, USA) y clonando la banda de 470pb en el pBluescript II SK digerido con HindIII y SmaI (pBS-*rrnT1T2*).

- Finalmente, mediante digestión con HindIII/Klenow y XbaI se escindió el fragmento de ADN conteniendo el terminador *rrnBT1T2* del pBS-*rrnT1T2* y se introdujo al vector pUC-linker-spacer-Hyg-spacer hacia el 3' del spacer que está a continuación del gen *hgh*, con digestión BamHI/Klenow y XbaI; así obtenemos la construcción pUC-linker-spacer-Hyg-spacer-*rrnT1T2*, de donde el casete desde el linker hasta el terminador fue escindido mediante digestión HindIII-XbaI y clonado en el vector pBluescript II SK digerido con estas mismas enzimas de restricción para obtener el plásmido con el casete de selección con bordes repetidos pBS-linker-spacer-Hyg-spacer-*rrnT1T2* (secuencia No.12).
- 10
- 15

d) Construcción del vector para la transformación estable y expresión de genes heterólogos en plastidios de plantas Angiospermas, pVTPA-f.

- El vector para la transformación estable y expresión de genes heterólogos en plastidios de plantas Angiospermas que esta invención propone se ensambló paso a paso de la siguiente forma: el casete de selección con bordes repetidos se escindió mediante digestión con NotI/Klenow y SalI del plasmidio pBS-linker-spacer-Hyg-spacer-*rrnT1T2*, y se insertó en el vector pBR322 previamente digerido con EcoRI/Klenow y SalI para producir el plásmido pBR322-sp-Hyg-sp-T; a continuación, el plásmido obtenido se digirió con BamHI/Klenow y XbaI y en él se insertó el borde-*rbcl* extraído de la construcción pBR322*rbcl*LOK mediante digestión con HindIII/Klenow y XbaI conformándose el vector pBR-sp-Hyg-sp-T-*rbcl*; finalmente, el borde-*atpB* se escindió del plásmido pBS*atpB*completo mediante digestión con HindIII y XhoI y se clonó en la construcción pBR-sp-Hyg-sp-T-*rbcl* previamente digerido con HindIII y SalI. De esta forma obtenemos un vector con la estructura descrita en la Figura 1-B, al que llamamos pVTPA-f (ver mapa en la Figura 2) y cuya secuencia nucleotídica del fragmento de ADN clonado entre las posiciones +651 (sitio SalI) y +1 (sitio EcoRI) del vector receptor pBR322, se muestra en la secuencia No.13.
- 20
- 25
- 30

Por sus características, el vector pVTPA-f permite la transformación estable de plastidios de Angiospermas y la obtención de plantas transplastómicas que expresen las proteínas recombinantes codificadas por los genes clonados en él, siempre y cuando los mismos estén

precedidos de secuencias de ADN que permitan la unión a los ribosomas y el inicio de la traducción.

e) Vector pVTPA: variante del vector pVTPA-f que permite insertar y expresar en plastidios varios genes como unidades transcripcionales independientes.

- 5 Una variante de vector para la transformación estable en plastidios y la expresión de varios genes como unidades transcripcionales independientes, se obtiene insertando dentro de los sitios de clonación del pVTPA-f una secuencia de ADN capaz de promover la transcripción en plastidios y secuencias terminadoras de la transcripción (ver Figura 1-E). Con este fin, y a modo de ejemplo, un fragmento sintético que codifica para el promotor de la subunidad 16S
- 10 de los ARN ribosomales de plastidios (Prn) (secuencia No. 14), y conteniendo sitios de clonación para facilitar las manipulaciones genéticas, fue insertado entre los sitios EcoRI y SmaI del vector pBluescript II SK, para obtener el plásmido pBS-Prn. Posteriormente, el fragmento de ADN conteniendo el promotor Prn fue escindido del pBS-Prn mediante digestión con las enzimas HindIII y MluI e insertado entre estos mismos sitios del vector
- 15 pVTPA-f para dar lugar a la construcción pVTPA (ver Figura 3, y secuencia No.15).

Ejemplo No.2: Expresión de una unidad monocistrónica heteróloga en plantas transplastómicas de tabaco (pVTPA-f-GUS).

- Para que utilizando el vector pVTPA-f se pueda expresar un gen heterólogo en plantas
- 20 transplastómicas, es necesario que el mismo posea una región de unión a ribosomas (RBS) a distancia adecuada (5 a 15 pb) del codón de inicio de la traducción. Por esta razón, a fin de facilitar la clonación de genes en nuestro vector para la transformación y expresión de genes en plastidios, diseñamos un vector intermediario (pVIEP) que permite clonar en él el gen de interés y después escindirlo mediante digestión enzimática para insertarlo en el vector
- 25 pVTPA-f (o pVTPA). El paso de clonación en el vector pVIEP ayuda a introducir un RBS al gen de interés, al mismo tiempo que permite adicionarle un terminador de la transcripción o promotor adicional para su expresión a partir del vector objeto de esta invención.

- Para construir el vector pVIEP, se clonó en el pBluescript II Sk digerido con EcoRI y SmaI un fragmento sintético de ADN que porta el promotor del gen psbA de tabaco con parte de su
- 30 región 5' no traducible (entre la posición -68 y -25 a partir del inicio de traducción) deletionada para evitar el control de la traducción de este gen por la luz (PpsbA*, secuencia No.16). Así obtenemos el plásmido pBSPpsbA, al cual se le adicionó a continuación del promotor PpsbA*, mediante digestión NdeI-SacI (el sitio SacI se pierde después de este clonaje), un fragmento sintético que incluye un minicistrón (para estabilizar el mRNA y

favorecer la traducción del mismo) y proporciona un RBS y múltiples sitios para el clonaje de un gen en él (secuencia No.17). Al plásmido resultante se llamó pBSPpsbA-linker.

El vector pVIEP se obtuvo finalmente insertando en el pBSPpsbA-linker digerido con BamHI y StuI el terminador de la transcripción T7 (T ϕ) obtenido del plásmido pET3c (Novagen, USA) mediante digestión con BamHI y EcoRV. La secuencia No.18 se corresponde con la estructura primaria del vector pVIEP (entre el sitio KpnI y el segundo sitio SalI), y su mapa se muestra en la Figura 4.

Una versión del vector intermediario pVIEP sin el promotor PpsbA* y sin minicistrón se obtuvo por digestión del mismo con EcoRI/Mung bean nucleasa y SnaBI, y religando este plásmido para obtener la construcción pVIEP-2.

Para expresar una unidad monocistrónica heteróloga en plantas transplastómicas, el gen *uidA* (*gus*) se obtuvo del plásmido pDMC200 (CAMBIA) mediante digestión con NcoI y SmaI, y fue clonado en el pVIEP-2 igualmente digerido para obtener el pVIEP-GUS; de este plásmido fue obtenida la secuencia que codifica para el gen *uidA* fusionada a un RBS mediante digestión con HindIII-SmaI y clonada bajo el promotor *rbcL* de arroz en el vector para transformación de plastidios pVTPA-f digerido con MluI/Klenow y HindIII. Esta construcción la llamamos pVTPA-f-GUS (secuencia No.19) que, mientras se mantenga la selección en las etapas de transformación, va a expresar el gen *uidA* e *hgh* como una unidad bicistrónica bajo el promotor *rbcL* de arroz; sin embargo, una vez que sea eliminado por recombinación el marcador de selección al cultivar las plantas transplastómicas en condiciones no selectivas, se mantendrá la expresión del gen *uidA* como una unidad monocistrónica. La funcionalidad de esta construcción se demostró obteniendo plantas transplastómicas de tabaco según la metodología que describimos a continuación:

Se toman hojas de plantas de tabaco (var. SR1) de entre 4 a 6 semanas de crecidas *in vitro* y se colocan con el lado abaxial hacia arriba en medio de inducción de brotes (SI: Sales y Vitaminas MS (Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant.* 1962, 15:493-497), BAP 1mg/L, NAA 0.1mg/L, Sacarosa 25g/L, Fitagel 4g/L, pH 5.7) con 0.4 M de manitol para un pre-tratamiento osmótico por 2 a 4h. Los microproyectiles para el bombardeo se preparan empleando partículas esféricas de oro de 0.6 μ m (BioRad), según protocolo publicado (Russell D.R., Wallace K.M., Bathe J.H., y otros. *Plant Cell Rep.* 1993, 12:165-169). La transformación se realiza empleando el sistema PDS-1000/He de Biorad a una presión de 1100 psi, una distancia de disparo de 6 cm y un disparo por hoja. Las hojas bombardeadas se mantienen en el mismo medio iso-osmótico por 14 a 16 horas adicionales y posteriormente

se pasan a medio SI por dos días. A continuación las hojas bombardeadas se cortan en fragmentos de 3x3mm aproximadamente y se transfieren, con el lado abaxial hacia abajo, a medio SI con 5mg/L de Higromicina-B (Duchefa, Holanda). Los callos resistentes y brotes verdes aparecen entre las 6 y 8 semanas de cultivo; se separan del tejido muerto y se transfieren al mismo medio selectivo para un segundo y tercer ciclos de selección en concentraciones crecientes de Higromicina-B (10mg/L y 15mg/L). Finalmente, los brotes resistentes obtenidos se pasan a medio MS (Sales y Vitaminas MS, Sacarosa 30g/L, Fitagel 4g/L, pH 5.7) con Higromicina-B a 15 mg/L, para su desarrollo y enraizamiento. Todo el cultivo se realiza con un régimen de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

La actividad GUS de algunos de los clones obtenidos resistentes a Higromicina fue analizada mediante ensayo histoquímico empleando X-Gluc según la metodología descrita por Jefferson (Jefferson R.A. Plant Mol. Biol. Rep. 1987, 5:387-405).

Los resultados de 3 experimentos de transformación y sus controles, se muestran en la Tabla 2

Tabla 2 Obtención de plantas transplastómicas con la construcción pVTPA-f-GUS.

Experimento	No.de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones GUS ⁺
I	10	11	11/11
II	10	14	14/14
III	10	9	9/9
Sumatoria	30	34	34/34
Controles negativos (bombardeados sin plásmido)	30	0	-

Adicionalmente, para algunos clones tomados al azar se demostró la integración del fragmento de ADN quimérico en el genoma de los cloroplastos mediante Southern blot (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2da edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press) de ADN de cloroplastos purificados por gradiente de sacarosa, digerido con Pst I y empleando como sonda marcada un fragmento del gen *rbcl* (Figura 5). La banda de aproximadamente 6.8 Kb esperada en los clones positivos fue detectada en todos los clones analizados y no en el control sin transformar (donde se detectó la banda característica de 21.5 Kb); cuando algunos de estos clones fueron propagados sin el agente de selección en el medio de cultivo, se observó en el Southern blot que la talla de la banda de ADN que hibrida con la sonda marcada disminuye hasta 5.5 Kb, lo

cual confirma la eliminación del gen marcador *hgh* por recombinación homóloga entre las secuencias que lo rodean.

Algunos clones transplastómicos después de ser propagados se llevaron a macetas con tierra para obtener de ellos semillas mediante autocruces. Germinando las semillas obtenidas en medio MS sin y con Higromicina-B a 15mg/L, se demostró la eliminación del marcador de selección en estos clones, mientras que la actividad GUS se mantuvo invariable, por lo que también se confirmó la naturaleza homoplásmica de las plantas así obtenidas.

En nuestros experimentos constatamos además, que a diferencia de lo observado cuando se emplea como marcador de selección la resistencia a Espectinomicina, no obtuvimos falsos transformantes al emplear Higromicina-B. Sin embargo, se hizo necesario establecer las concentraciones adecuadas del agente selectivo para poder recobrar las plantas transformadas.

Todos estos datos experimentales confirman la funcionalidad del vector objeto de la presente invención, y su utilidad para obtener plantas transplastómicas que expresen genes de interés cualesquiera que sea la fuente de los mismos.

Ejemplo No.3: Expresión bajo dos promotores de una unidad monocistrónica heteróloga en plantas transplastómicas de tabaco (pVTPA-aadA).

Utilizando el vector pVTPA es posible expresar en plastidios un gen bajo los promotores *rbcL* de arroz y *Prn*; para esto el gen que codifica para la amino-glicósido adenil-transferasa (*aadA*, confiere resistencia a los antibióticos estreptomicina, espectinomicina y otros) fue amplificado por PCR a partir del vector pDE1001 (Dpto. de Genética, Univ. de Gante Bélgica) utilizando los oligonucleótidos descritos en las secuencias No.20 y No.21. El producto de la reacción de PCR se clonó directamente en el vector pVTPA digerido con *XhoI*/*Klenow* bajo los dos promotores antes mencionados para dar lugar a la construcción pVTPA-aadA (secuencia No.22). La obtención de plantas transplastómicas de tabaco se realizó según la metodología descrita en el Ejemplo anterior (Ejemplo No.2), con la particularidad de que inicialmente se realizó la selección de los clones transplastómicos utilizando espectinomicina a 500 mg/L en el medio SI, y después estreptomicina a 500 mg/L durante el segundo ciclo de selección. En estos experimentos se realizaron transformaciones adicionales con el vector pVSR326MOD (CIIGB, Nueva Delhi, India) para obtener datos que nos permitan hacer comparaciones en cuanto a las frecuencias de obtención de plantas transplastómicas. El vector pVSR326MOD tiene clonado en la región entre los genes *rbcL* y *accD* de tabaco dos casetes de expresión que contienen el gen *gus* bajo la regulación del promotor *psbA* y el terminador de este mismo gen, y el gen *aadA* bajo el promotor *Prn* y el

terminador del gen *rbcL*. Los resultados de estas transformaciones después de dos rondas de regeneración/selección y tres sesiones de cultivo sin selección se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Comparación de la frecuencia de transformación entre el pVTPA-*aadA* y el pVSR326MOD.

Experimento	Construcción genética	No. de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a Espectinomicina	No. de clones/hoja bombardeada
I	pVTPA- <i>aadA</i>	10	19	1.9
	pVSR326MOD	10	13	1.3
II	pVTPA- <i>aadA</i>	10	11	1.1
	pVSR326MOD	10	8	0.8
III	pVTPA- <i>aadA</i>	10	16	1.6
	pVSR326MOD	10	10	1.0
Sumatoria	pVTPA- <i>aadA</i>	30	46	1.5 ± 0.4
	pVSR326MOD	30	31	1.0 ± 0.3
Controles negativos (bombardeados sin plásmido)	-	20	4	0.2

5

Los resultados experimentales obtenidos confirman nuestra hipótesis de que el vector objeto de esta invención tiene una mayor frecuencia de producción de plantas transplastómicas que otros vectores que portan múltiples secuencias de origen plastídico. Adicionalmente, demostramos la posibilidad que nos brinda el vector que proponemos para la expresión de un gen foráneo (en este caso el *aadA*) bajo dos promotores en tandem, *rbcL* y *Prn*.

10

Ejemplo No.4: Expresión de una unidad bi-cistrónica heteróloga en plantas transplastómicas de tomate (pVTPA-f-GUS-*aadA*).

En el vector objeto de esta invención es posible expresar varios genes en forma de una unidad policistrónica. A modo de ilustración de esta posibilidad, introdujimos a continuación del gen *gus* en el vector pVTPA-f-GUS (Ejemplo No.2) el gen *aadA* para formar una unidad tricistrónica (considerando que el gen marcador *hgh* también será expresado como parte del ARNm producido a partir del promotor *rbcL*), que después de permitir la eliminación del marcador de selección al ser obtenidas las plantas transplastómicas homoplásmicas expresará en ellas la β -glucuronidasa y la amino-glicósido adenil-transferasa.

15

El gen *aadA* fue amplificado mediante PCR como se describe en el Ejemplo No.3, y clonado en el sitio *ApaI* del plásmido pVTPA-f-GUS, para dar lugar al vector pVTPA-f-GUS-*aadA* (secuencia No.23). Este nuevo vector fue empleado para obtener plantas transplástomicas de tomate según la metodología descrita a continuación:

- 5 Semillas de tomate de la variedad Campbell-28 se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 10% por 15 minutos, y después se lavaron con abundante agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas por 12 días en el medio MSO (Sales de MS; Vitaminas B5 de Gamborg; 30 g/L Sacarosa; 8 g/L Fitoagar; pH 5.8) diluido a la mitad, y las hojas cotiledonales fueron
- 10 colectadas en medio MSO líquido y cultivadas con el lado abaxial hacia abajo en una placa con medio sólido MSO + 1mg/L de zeatina con 0.4 M de manitol para un pre-tratamiento osmótico por 4h. Los microproyectiles para el bombardeo se prepararon empleando partículas esféricas de oro de 0.6 μ m y la transformación se realiza empleando el sistema PDS-1000/He de Biorad a una presión de 1100 psi, una distancia de disparo de 6 cm y un disparo por placa. Los cotiledones bombardeados se mantienen en el mismo medio iso-osmótico por 14 a 16
- 15 horas adicionales y posteriormente se pasan a medio MSO + zeatina por dos días con el lado abaxial hacia arriba. A continuación los cotiledones bombardeados se transfieren, con el lado abaxial hacia arriba, a medio MSO + zeatina con 5mg/L de Higromicina-B (Duchefa, Holanda). Los callos resistentes y brotes verdes aparecen entre las 3 y 6 semanas de cultivo; se separan del tejido muerto y se transfieren al mismo medio selectivo para un segundo ciclo
- 20 de selección a concentración de 10mg/L de Higromicina-B. Después de otras 3-4 semanas, los brotes y callos resistentes se pasan para su desarrollo a medio MSO + 0.1 mg/L de zeatina (con Higromicina-B a 15 mg/L), y 3 semanas más tarde a medio MSO + higromicina para su enraizamiento. Todo el cultivo se realiza con un régimen de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. La resistencia a 500 mg/L de Espectinomicina (*Spc^r*), así como la expresión del
- 25 gen GUS (mediante ensayo histoquímico), fue evaluada en los clones obtenidos. Los resultados de tres experimentos de transformación se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Obtención de plantas transplástomicas de tomate con la construcción pVTPA-f-GUS-*aadA*.

Experimento	No.de cotiledones bombardeados	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones <i>Spc^r</i>	Clones GUS ⁺
I	75	6	6	6
II	100	9	9	9
III	100	7	7	7
Sumatoria	275	22	22	22

Al cultivar las plantas en tierra, no observamos diferencias fenotípicas entre nuestras plantas transplastómicas y plantas no manipuladas de tomate, por lo que confirmamos la funcionalidad de la proteínas atpB y rbcL híbridas, y la factibilidad de manipular genéticamente las mismas como vía para mejorar la actividad metabólica de los plastidios.

El presente ejemplo ilustra no solo la potencialidad del vector por nosotros desarrollado para expresar varios genes como parte de un mismo ARNm, sino además, confirma la universalidad de los vectores objeto de esta invención como vehículo para la obtención de clones transplastómicos de plantas Angiospermas diferentes de las plantas donantes de las secuencias empleadas como bordes para la integración del ADN heterólogo en el genoma de los plastidios.

Ejemplo No.5: Expresión de dos unidades transcripcionales independientes en plantas transplastómicas de tabaco (pVTPA-HB-aadA). Obtención de plantas transplastómicas que expresan un antígeno vacunal multimérico.

El gen que codifica para el antígeno de superficie de la hepatitis B (*HBsAg*) (Valenzuela P; Gray P; Quiroga M; Zaldivar J; Goodman H.M; Rutter W.J. Nature 1979, 280:815-819) se obtuvo del plásmido pSAO503 (CIGB, Cuba) mediante digestión con EcoRI/Klenow y NcoI, y se introdujo en el vector pVIEP-2 (ver Ejemplo No.2) digerido con NcoI y SmaI, para colocarle un sitio de unión a ribosomas ante el codón de inicio de la traducción. De esta forma obtuvimos el plásmido pVIEP-2-HB, de donde la banda de aproximadamente 820 pb conteniendo el gen que codifica para el antígeno de superficie de la hepatitis B se obtuvo mediante digestión con XhoI y se clonó en el vector pVTPA-aadA (ver Ejemplo No.3) digerido con SalI. Un clon con el gen *HBsAg* clonado en orientación correcta bajo el promotor de *rbcL* de arroz, y que además expresa los genes marcadores *aadA* e *hgh* bajo el promotor *Prm*, se denominó pVTPA-HB-aadA (Secuencia No.24).

El vector pVTPA-HB-aadA se utilizó para obtener plantas transplastómicas de tabaco que expresan el antígeno de superficie de la hepatitis B, mediante el protocolo de transformación descrito en el Ejemplo No.2. La selección de los clones transplastómicos se realizó inicialmente con Higromicina-B (10mg/L) y al final fue chequeada la resistencia de los mismos a Espectinomicina (500mg/L), y la expresión del *HBsAg* mediante un ensayo tipo ELISA específico (C.I.G.B, Cuba), y Western blot (Figura 6). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Obtención de plantas transplastómicas de tabaco con la construcción pVTPA-HB-aadA.

Experimento	No.de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a Higromicina	No. de clones resistentes a Espectinomicina	No. de clones que expresan el HBsAg (por ELISA)
I	10	13	13	9
II	10	11	11	7
Sumatoria	20	24	24	16

5

Nuestros resultados confirman la utilidad del vector objeto de esta invención para expresar dos o más genes como unidades transcripcionales independientes en el genoma de las plantas transplastómicas. Adicionalmente, se confirma la utilidad de este vector para expresar en plastidios genes que codifican para proteínas útiles, formen estas complejos multiméricos o no. En particular logramos expresar el antígeno multimérico de superficie del virus de la hepatitis B. Es obvio que lo aquí ejemplificado es aplicable a otros antígenos vacunales, y que los mismos, una vez expresados en las células vegetales, pueden ser formulados como preparaciones capaces de inducir inmunidad contra estos patógenos al ser administradas al hombre o a animales. Otras proteínas multiméricas que pudieran ser expresadas mediante este vector serían las inmunoglobulinas.

10

15

Ejemplo No.6: Expresión de un gen heterólogo en plastidios bajo dos promotores y un minicistrón (pVTPA-GUS1-aadA y pVTPA-GUS3-aadA).

20

El vector intermediario para la clonación y expresión de genes en los vectores objetos de esta invención, pVIEP (ver Ejemplo No.2), permite clonar en él un gen bajo el promotor PpsbA* y un minicistrón diseñado para aumentar la estabilidad y promover la traducción de los ARNm producidos. En este vector se clonó en gen *uidA* tal y como se describe en el Ejemplo No.2 para obtener el plásmido pVIEP-GUS1.

25

Para comprobar la funcionalidad del minicistrón, se realizó una construcción genética en la cual el minicistrón fue eliminado del pVIEP mediante digestión NdeI + SnaBI, tratamiento con nucleasa S1 y recircularización del plasmidio para obtener el vector pVIEP-3, donde se clonó el gen *uidA* de la manera anteriormente descrita dando lugar a plásmido pVIEP-GUS3. Ambos casetes conteniendo el gen *gus* fueron obtenidos de los vectores intermediarios por digestión con HindIII y clonados en el vector pVTPA-aadA igualmente digerido. Las construcciones finalmente obtenidas que contienen el gen *gus* bajo los promotores *rbcl* de

arroz y PpsbA*, se denominaron pVTPA-GUS1-aadA y pVTPA-GUS3-aadA respectivamente, y con ellas se procedió a transformar plantas de tabaco según el protocolo descrito en el Ejemplo No.2.

- 5 Plantas transplastómicas fueron obtenidas con ambas construcciones, y se procedió a comparar los niveles de expresión GUS de 5 clones de cada una de ellas por el método fluorimétrico empleando 4-MUG según la metodología descrita por Jefferson (Jefferson R.A. Plant Mol. Biol. Rep. 1987, 5: 387-405). Los resultados se muestran en la tabla 6:

Tabla 6. Expresión del gen uidA en plastidios de tabaco bajo dos promotores y un minicistrón.

Construcción	Clones	Actividad GUS (pM 4-MU/min x µg de proteínas totales)	Valores medios ± DS
pVTPA-GUS1-aadA	GUS1-1.3.1	2490	2475 ± 903
	GUS1-3.2.2	1736	
	GUS1-9.1.2	4125	
	GUS1-18.1.1	957	
	GUS1-23.2.1	3068	
pVTPA-GUS3-aadA	GUS3-2.1.3	517	978 ± 300
	GUS3-7.1.1	1174	
	GUS3-11.2.1	891	
	GUS3-19.2.3	1532	
	GUS3-21.1.1	775	

10

Como se muestra en la tabla anterior, se obtienen altos valores de actividad GUS en ambas construcciones que expresan el gen *uidA* bajo los promotores en tandem *rbcl* de arroz y PpsbA* (promotor *psbA* modificado). Adicionalmente se evidenció que los valores promedios de la actividad GUS en las plantas transformadas con la construcción que contiene el minicistrón (pVTPA-GUS1-aadA) son significativamente superiores, por lo que se demuestra la funcionalidad de este elemento genético en los plastidios y su utilidad como herramienta que permite incrementar la expresión de los genes en estos organelos celulares.

Ejemplo No.7: Obtención de plantas transplastómicas de arroz con la construcción pVTPA-f-GUS-aadA

15

- 20 Plantas transplastómicas de arroz fueron obtenidas de forma repetible empleando la siguiente metodología:

Se utilizan callos embriogénicos (21 días) formados en medio N6-2 (Sales y vitaminas del medio N6 (Chu C.C; y otros. Scientia Sinic1975, 18:659); 0.1g/L de mio-inositol; Hidrolizado de caseína 1 g/L; 2,4 D a 2mg/L; Sacarosa 30g/L; Fitagel 3g/L, pH 5.7) a partir de semillas maduras de arroz. Estos callos se subcultivan 5 días en medio fresco N6-2 y posteriormente se pasan a medio N6-2 con 3mg/L de kinetina por 48-72 horas en la oscuridad. Antes del bombardeo los callos se subcultivan en el mismo medio suplementado con 0.4 M de manitol para el pre- tratamiento osmótico. Para el disparo se colocan 30 callos en el centro de la placa para ser bombardeados con las siguientes condiciones (1100 psi de presión, 6cm de distancia, partículas de oro de 0.6 μ m cargadas con el plasmidio pVTPA-f-GUS-aadA y un disparo por placa). Después del disparo los callos permanecen en el mismo medio osmótico por 16h en la oscuridad y a continuación se subcultivan 2 días en medio N6-2 sin manitol en las mismas condiciones. Seguidamente, los callos son transferidos a medio N6-2 con 20 mg/L de Higromicina-B. A los 10 días, los callos capaces de crecer en presencia del antibiótico son transferidos al mismo medio fresco para un segundo ciclo de selección por 10 días. Finalmente, los callos resistentes se pasan a medio de regeneración KIBAN modificado (Sales y vitaminas del medio MS; Kinetina 3 mg/L; BAP 0.5 mg/L; NAA 1 mg/L; Maltosa 30 g/L; pH5.7; Fitagel 4.5 g/L) más 30 mg/L de Higromicina-B, y los brotes verdes de aproximadamente 2 cm obtenidos después de 3-4 semanas de cultivo en régimen de 16h luz y 8h oscuridad, se pasan a un ciclo de micropropagación en medio MS líquido modificado (Sales y vitaminas del medio MS; Sacarosa 30 g/L; BAP 5mg/L, pH 5.7) con 20mg/L de Higromicina. Los brotes se colocan en erlenmeyers con 50 ml de dicho medio y se incuban en agitación a 150 rpm a 28 °C con un foto período de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Se obtienen aproximadamente 7 brotes axilares por explante al cabo de 7 días, los cuales se pasan a enraizar en medio MS sólido más 30 g/L de Sacarosa y 30 mg/L de Higromicina-B.

En los clones trasplastómicos obtenidos se evaluó la resistencia a Espectinomicina (a 500 mg/L), así como la expresión del gen *gus* (mediante ensayo histoquímico). Adicionalmente se comprobó que el pre-tratamiento de las células a bombardear con citoquininas, aumenta significativamente la frecuencia de obtención de plantas trasplastómicas. Los resultados de estos experimentos de transformación se muestran en la siguiente tabla 7:

Tabla 7. Obtención de plantas trasplastómicas de arroz (var. IAC-28) con la construcción pVTPA-f-GUS-aadA con y sin emplear pre-tratamiento con citoquininas (kinetina a 3 mg/L).

Experimento	No.de placas bombardeadas	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones Spc ^r	Clones GUS ⁺
I	10	2	2	2
II	10	1	1	1
III + Kinetina	10	7	7	7
IV + Kinetina	10	8	8	8

El presente ejemplo confirma mediante la transformación de una especie monocotiledónea, la universalidad y funcionalidad de los vectores objetos de esta invención.

5 Ejemplo No.8: Obtención de plantas transplastómicas de caña de azúcar con la construcción pVTPA-f-GUS-aadA.

La obtención de plantas transplastómicas de caña de azúcar se realizó según el siguiente protocolo:

- 10 Se toman los cogollos de plantas de campo de caña de azúcar (var. Ja60-5) de 6 meses de edad, se desinfectan con etanol al 70% por 1 minuto y luego por 10 minutos en hipoclorito de sodio al 10%, se lavan abundantemente con agua destilada estéril. Se aislan segmentos de 0.5x1cm de la base de las hojas jóvenes y se cultivan a la luz en medio sólido P+5 (100mg/L de mio-Inositol; 500mg/L de Hidrolisado de caseína; Sales y Vitaminas MS; Sacarosa 20g/L; 5mg/L de 2,4D; Fitagel 4g/L; pH 5.7) con 3 mg/L de kinetina por 48 horas, seguido de un
- 15 cultivo en el mismo medio con 0.4 M de Manitol por 6-8h, a la luz. Se bombardea empleando partículas esféricas de oro de 0.6 μ m cargadas con el plásmido pVTPA-f-GUS-aadA, empleando el sistema PDS-1000/He de Biorad a una presión de 1100 psi, una distancia de disparo de 6 cm y un disparo por hoja. Los explantes bombardeados se mantienen en el medio P+5 iso-osmótico por 24 horas adicionales a la oscuridad, y posteriormente se pasan a
- 20 medio P+5 por dos días, para después continuar su cultivo a la oscuridad en medio P+5 con Higromicina-B a 15mg/L. Callos resistentes a Higromicina aparecen a las 4 semanas de cultivo y se pasan a regenerar a la luz en medio sólido P- (igual al P+5 pero sin 2,4D) con Higromicina-B. Los brotes regenerados se individualizan después de 4-6 semanas de cultivo y se pasan a enraizar en medio P- con el agente selectivo a 20 mg/L.
- 25 La resistencia a Espectinomicina (a 500 mg/L), así como la expresión del gen *gus* (mediante ensayo histoquímico), fue evaluada en los clones obtenidos. Los resultados de dos experimentos de transformación se muestran en la siguiente tabla 8:

30 Tabla 8. Obtención de plantas transplastómicas de caña de azúcar con la construcción pVTPA-f-GUS-aadA.

Experimento	No.de explantes bombardeados	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones Spc ^r	Clones GUS ⁺
I	20	11	11	11
II	20	7	7	7

El presente ejemplo confirma nuevamente, esta vez mediante la transformación de una especie monocotiledónea, la universalidad de los vectores objetos de esta invención como vehículo para la obtención de clones transplastómicos de plantas Angiospermas diferentes de las plantas donantes de las secuencias empleadas como bordes para la integración del ADN heterólogo en el genoma de los plastidios.

Ejemplo No.9. Obtención de plantas transplastómicas con caracteres agronómicos deseables.

La obtención de plantas transplastómicas con nuevos caracteres agronómicos incorporados es fundamental para la lucha contra enfermedades, plagas y malezas, el incremento de los rendimientos, la disminución de los costos y mejores cualidades de los productos, sin que exista el peligro de que escapen al ambiente de los nuevos genes introducidos.

El gen *pat* (*bar*) de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson C.J; Movva N.R; Tizard R; Cramer R; Davies J.E; y otros. EMBO Journal 1987, 6:2519-2523) que codifica para la fosfinotricina (ingrediente activo del herbicida BASTATM) acetil transferasasa, fue obtenido a partir del plásmido pBS-Bar (C.I.G.B.) mediante digestión XbaI/S1 nucleasa y BamHI y se clonó en el vector pVIEP-2 (Ejemplo No.2) digerido con NcoI/ S1 nucleasa y BamHI, para obtener el plásmido pVIEP2-Bar que fue posteriormente digerido con XhoI, y el fragmento de ADN de aproximadamente 670 pb conteniendo el gen *pat* con un RBS se insertó en el vector pVTPA digerido con XhoI para obtener la construcción pVTPA-Bar (secuencia No.25). Las plantas transplastómicas de tabaco fueron obtenidas según la metodología descrita en el Ejemplo No.2 realizando la selección con 5 mg/L de fosfinotricin (Duchefa, Holanda) en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla 9.

Tabla 9. Obtención de plantas transplastómicas de tabaco resistentes a herbicida con la construcción pVTPA-Bar.

Experimento	No.de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a fosfinotricin (5mg/L)
I	10	13
II	10	14
Control transformado sin plásmido	10	0

Es obvio que el clonaje y expresión en los vectores objeto de esta invención de otros genes que confieran resistencia a herbicidas, como el glifosato, asulam, sulfonilureas, imidazolinonas y bromoxinil, por ejemplo, producirán plantas transplastómicas resistentes a estos productos químicos. Igualmente, es obvio que con el empleo del vector objeto de esta invención es factible introducir y expresar en las plantas transplastómicas genes que confieran resistencia a plagas y enfermedades, como por ejemplo los genes que codifican para los cristales proteicos entomocidas de *Bacillus thuringiensis*; o para proteínas con actividad antimicrobiana como quitinasas y glucanasas; o anti-stress abióticos como colina oxidasa. La modificación o introducción de genes que aumenten la eficiencia del proceso fotosintético, o la calidad de los productos vegetales, son otras de las muchas acciones factibles de realizar con el empleo del vector universal para la transformación de plastidios de Angiospermas que aquí se propone.

Ejemplo No.10: Expresión de proteínas de utilidad no agronómica en plastidios.

En el Ejemplo No.5 demostramos la utilidad del vector que aquí proponemos para establemente introducir y expresar en plastidios de plantas Angiospermas genes que codifican para proteínas multiméricas. Otras proteínas de uso médico, veterinario o industrial son igualmente factibles de ser producidas en plantas transplastómicas mediante el empleo de nuestro sistema de vectores de transformación/expresión.

Para expresar en cloroplastos el agente fibrinolítico estreptoquinasa, de gran utilidad terapéutica para el tratamiento de trombosis e infartos del miocardio, el fragmento de ADN de 1254 pb que codifica para la proteína madura SKC-2 de *Streptococcus* fue escindido del vector pEKG-3 (Estrada M.P; Hernández L; Pérez A; Rodríguez P; Serrano R; Rubiera R; Pedraza A; y otros. Bio/Technology 1992, 10:1138-1142) mediante digestión con EcoRI, tratamiento con nucleasa S1 y finalmente digestión con BamHI, e insertado en el vector intermediario pVIEP (ver Ejemplo No.2) previamente digerido con NcoI, tratado con S1 nucleasa y digerido con BamHI. A partir del plásmido obtenido, pVIEP-Estrep, se obtuvo por digestión SalI + XhoI el casete para la expresión del gen de la estreptoquinasa en plastidios bajo el promotor PpsbA* y el minicistrón; este casete se clonó en el vector pVTPA (ver Ejemplo No.1) digerido con SalI y XhoI para obtener el plasmidio pVTPA-Estrep (Secuencia No.26).

Con el vector pVTPA-Estrep se procedió a transformar plantas de tabaco según el protocolo descrito en el Ejemplo No.2, los resultados se muestran en la tabla 10 (la actividad fibrinolítica de la estreptoquinasa producida en un grupo de clones se determinó mediante la

Técnica de placa caseína/plasminógeno (Estrada M.P; Hernández L; Pérez A; Rodríguez P; Serrano R; Rubiera R; Pedraza A; y otros. Bio/Technology 1992, 10:1138-1142).

Tabla 10. Expresión de Estreptoquinasa en plastidios de tabaco.

No.de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones	Actividad fibrinolítica (UI/mg de proteínas)
10	14	Strep2.3.1	650
		Strep4.5.2	400
		Strep5.2.2	1500
		Strep9.2.2	200
		Strep12.3.1	350
		Control negativo	0

5

Estos resultados confirman la utilidad de los vectores objeto de esta invención para expresar en plastidios genes que codifican para proteínas útiles, y en particular proteínas de uso farmacéutico o veterinario como trombolíticos, interferones, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, antígenos, receptores celulares u otras. Es obvio que lo aquí ejemplificado es aplicable también a la expresión en plastidios, empleando los vectores de transformación/expresión descritos en el presente documento, de otros tipos de enzimas y proteínas de uso industrial como lipasas, proteasas, etc.

10

Ejemplo No.11: Expresión de inmunoglobulinas en plastidios.

15 El fragmento de ADN que codifica para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal CB-Hep.1 específico contra el HBsAg fueron obtenidas mediante digestión NcoI – XbaI de los plasmidios pHESΩHBsAgCL y pHESΩHBsAgCH (Nadia Ramírez, “Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) transgénico: un sistema para la producción de un anticuerpo anti-HBsAg y de sus fragmentos”, Tesis de doctorado, C.I.G.B., 2002) e insertadas en el vector

20 pVIEP digerido con estas mismas enzimas para obtener los plásmidos pVIEP-Hc y pVIEP-Lc. A continuación, el fragmento que codifica para la cadena ligera fue escindido del pVIEP-Lc mediante digestión SnaBI – BamHI, e insertado a continuación del que codifica para la cadena pesada en el plásmido pVIEP-Hc por digestión con SmaI – BamHI, para obtener la construcción bicistrónica pVIEP-HcLc, de donde ambos genes fueron finalmente

25 introducidos en el vector para la transformación de plastidios de Angiospermas pVTPA-f mediante digestión HindIII; así, después de buscar el clon con la orientación correcta, se obtuvo el plásmido pVTPA-HcLc que fue introducido a plastidios de tabaco al igual que se describió en el Ejemplo No.2.

Las plantas transplastómicas obtenidas fueron analizadas por Western blot para detectar la presencia de ambas cadenas del anticuerpo CB-Hep.1 (Figura 7), y adicionalmente se demostró la funcionalidad de la inmunoglobulina recombinante obtenida empleando un extracto de las plantas transplastómicas para detectar la presencia del HBsAg en un ELISA
5 que se reveló con un policlonal de conejo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina.

De esta forma, a la vez que demostramos la posibilidad de obtener con nuestros vectores de transformación/expresión anticuerpos completamente funcionales en las plantas transplastómicas, reafirmamos la posibilidad de expresar y ensamblar correctamente proteínas multiméricas en plástidos.

10

15

REIVINDICACIONES

- 1) Un vector de ADN útil para la transformación estable y expresión de genes en plastidios, donde el gen a expresar se introduce en una región intergénica artificial formada por la combinación de dos regiones 5' no traducibles de genes que se transcriben en direcciones divergentes y pertenecientes a plantas de divisiones o clases diferentes.
- 2) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 1, útil para lograr una alta frecuencia de transformación estable y expresión de genes en plastidios de plantas Angiospermas, con las siguientes características:
- a) contiene una región intergénica artificial donde es posible insertar secuencias de ADN que codifican para un polipéptido, bajo señales apropiadas para su transcripción y traducción en plastidios empleando secuencias terminadoras de la transcripción de origen no plastídico,
- b) la región intergénica artificial está flanqueada por dos genes que se transcriben de forma natural en el genoma de los plastidios en direcciones opuestas, y cuyas secuencias nucleotídicas son idénticas a secuencias codificantes de los genes *atpB* y *rbcL* pertenecientes a plastidios de plantas Angiospermas de clases diferentes.
- c) la región intergénica artificial se compone de: secuencias 5' reguladoras de la transcripción y traducción de los genes *atpB* y *rbcL*; sitios de restricción para la inserción de genes de interés seguidos de un terminador de origen no plastídico; y de una segunda región 5' reguladora de la transcripción y traducción de un gen *rbcL* perteneciente a plastidios de Angiospermas de una clase diferente a la anterior.
- 3) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, que contenga una secuencia nucleotídica flanqueante homóloga a la secuencia del gen plastídico *rbcL* de tabaco o arroz.
- 4) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 3, donde la secuencia homóloga al gen *rbcL* comprende al menos un fragmento de la secuencia de nucleótidos que abarca desde la posición -291 de la secuencia nucleotídica que codifica para esta proteína en plastidios de tabaco, hasta la posición +1233 a partir del codón de inicio de traducción de este gen.
- 5) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 4 cuya secuencia flanqueante homóloga al gen *rbcL* comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 4.

- 6) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, que contenga una secuencia nucleotídica flanqueante homóloga a la secuencia del gen plastídico *atpB* de arroz o tabaco.
- 7) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 6, donde la secuencia homóloga al gen *atpB* comprende al menos un fragmento de la secuencia de nucleótidos que abarca desde la posición -654 de la secuencia nucleotídica que codifica para esta proteína en plastidios de arroz, hasta la posición +1211 a partir del codón de inicio de traducción de este gen.
- 8) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 7 cuya secuencia flanqueante homóloga al gen *atpB* comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 8.
- 9) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, donde el terminador de la transcripción de origen no plastídico presente en la región intergénica artificial sea el terminador bidireccional rrnBT1T2 u otro homólogo a este.
- 10) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, que contenga insertado en la región intergénica artificial un gen que permita la selección de las plantas transplastómicas.
- 11) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 10, donde el gen que permite la selección puede ser eliminado mediante recombinación homóloga entre secuencias de ADN repetidas que se encuentran a ambos extremos del gen.
- 12) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 11, donde el gen que permite la selección codifica para una proteína que permite a la célula vegetal sobrevivir en presencia de un compuesto antimicrobiano.
- 13) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 12, donde el compuesto antimicrobiano en cuestión pertenezca al grupo de los amino-glicósidos.
- 14) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 13, donde el compuesto antimicrobiano sea la Higromicina-B.
- 15) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 13, donde el compuesto antimicrobiano sea la Espectinomicina.
- 16) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 12, donde el compuesto antimicrobiano en cuestión pertenezca al grupo de las sulfonamidas.
- 17) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 16, donde el compuesto antimicrobiano sea la sulfadiazina.

- 18) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 10, donde el gen que permite la selección codifica para una proteína que permite a la célula vegetal sobrevivir en presencia de un compuesto herbicida.
- 19) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores de la glutamina sintetasa.
- 20) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 19, donde el compuesto herbicida sea el glufosinato (fosfinotricina).
- 21) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 19, donde el compuesto herbicida sea el bialaphos.
- 22) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS).
- 23) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 22, donde el compuesto herbicida en cuestión sea el glifosato (N-fosfometil glicina).
- 24) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores de la ruta de síntesis del folato.
- 25) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 24, donde el compuesto herbicida en cuestión sea el asulam (metil-(4-aminobencenosulfonil)-carbamato).
- 26) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores de la acetolactato sintasa.
- 27) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 26, donde el compuesto herbicida en cuestión sea una sulfonilurea.
- 28) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 26, donde el compuesto herbicida en cuestión sea una imidazolinona.
- 29) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores del fotosistema II.
- 30) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 29, donde el compuesto herbicida en cuestión sea el bromoxinil (3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo).
- 31) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 10, donde el gen que permite la selección codifica para una proteína que permite a la célula vegetal sobrevivir en presencia de un compuesto tóxico.

- 32) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 31, donde el compuesto tóxico en cuestión sea la betaina aldehído.
- 33) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 8, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-A o variantes de la misma.
- 5 34) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-B o variantes de la misma.
- 35) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-C o variantes de la misma.
- 36) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-D o variantes de la misma.
- 10 37) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-E o variantes de la misma.
- 38) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-F o variantes de la misma.
- 15 39) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, que presente en la segunda región 5' no traducible del gen *rbcL* una secuencia funcionalmente homóloga al sitio de unión del represor lacI de *Escherichia coli*.
- 40) Un vector de ADN que presente 5' al inicio de traducción del gen *rbcL* una secuencia de ADN que permita la represión de la transcripción de este gen en condiciones de no inducción, de forma tal que facilite el mantenimiento y multiplicación del vector en un
- 20 hospedero cualquiera.
- 41) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 40, que presente en la región 5' no traducible del gen *rbcL* una secuencia funcionalmente homóloga al sitio de unión del represor lacI de *Escherichia coli*.
- 25 42) Un vector de ADN según la reivindicación 41, donde la secuencia nucleotídica del operador del operón lactosa de *Escherichia coli* se corresponda al menos en parte a la secuencia destacada en la secuencia SEQ. ID. NO: 3
- 43) Un vector de ADN según las reivindicaciones de la 1 a la 11, que contenga insertado en la región intergénica artificial una o más unidades transcripcionales monocistrónicas o
- 30 policistrónicas bajo uno o más promotores funcionales en plastidios.

- 44) Un vector de ADN según las reivindicaciones de la 12 a la 17, que contenga insertado en la región intergénica artificial una o más unidades transcripcionales monocistrónicas o policistrónicas bajo uno o más promotores funcionales en plastidios.
- 5 45) Un vector de ADN según las reivindicaciones de la 18 a la 38, que contenga insertado en la región intergénica artificial una o más unidades transcripcionales monocistrónicas o policistrónicas bajo uno o más promotores funcionales en plastidios.
- 46) Un vector de ADN según las reivindicaciones 43, 44 ó 45, donde al menos uno de los promotores funcionales en plastidios sea uno de los promotores *rbcL* de la región intergénica artificial.
- 10 47) Un vector de ADN según la reivindicación 46, donde uno de los promotores funcionales en plastidios es el promotor *rbcL* de arroz comprendido en la secuencia SEQ. ID. NO: 8.
- 48) Un vector de ADN según las reivindicaciones 43, 44 ó 45, donde al menos uno de los promotores funcionales en plastidios sea el promotor *psbA** comprendido en la secuencia
- 15 SEQ. ID. NO:16 o variantes de la misma.
- 49) Un vector de ADN según la reivindicación 48, donde un minicistrón se encuentre funcionalmente ligado al promotor *psbA**.
- 50) Un vector de ADN según la reivindicación 49, donde el minicistrón posea una secuencia nucleotídica homóloga a la secuencia destacada en la secuencia SEQ. ID.
- 20 NO:17 o variantes de la misma.
- 51) Un vector de ADN para la introducción y expresión estable de genes en plastidios que utilice un minicistrón para aumentar la expresión de los genes introducidos a las células transplastómicas.
- 52) Un vector de ADN según las reivindicaciones 43, 44 ó 45, donde al menos un gen de
- 25 interés agrícola, veterinario, farmacéutico, alimentario o industrial sea componente de una de las unidades transcripcionales presentes en el vector.
- 53) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para una proteína con actividad insecticida.
- 54) Un vector de ADN según la reivindicación 53, donde la proteína insecticida
- 30 pertenezca a la familia de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*.
- 55) Un vector de ADN según la reivindicación 53, donde la proteína insecticida sea un inhibidor de proteasas.

- 56) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para un polipéptido con actividad anti-microbiana.
- 57) Un vector de ADN según la reivindicación 56, donde el polipéptido con actividad anti-microbiana pertenezca a uno de los grupos de las proteínas vegetales relacionadas con la patogenicidad (PR-proteínas).
- 58) Un vector de ADN según la reivindicación 57, donde la PR-proteína en cuestión sea una glucanasa.
- 59) Un vector de ADN según la reivindicación 57, donde la PR-proteína en cuestión sea una quitinasa.
- 60) Un vector de ADN según la reivindicación 57, donde la PR-proteína en cuestión sea una proteína tipo-taumatina.
- 61) Un vector de ADN según la reivindicación 56, donde el polipéptido en cuestión sea una proteína inactivadora de ribosomas (RIP).
- 62) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para una proteína que confiera resistencia a estrés abióticos.
- 63) Un vector de ADN según la reivindicación 62, donde la proteína en cuestión tenga actividad colina oxidasa.
- 64) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para una proteína que contribuya a aumentar el rendimiento productivo de la planta donde este se exprese.
- 65) Un vector de ADN según la reivindicación 64, donde la proteína en cuestión esté involucrada en el mejoramiento de la capacidad fotosintética de la planta.
- 66) Un vector de ADN según la reivindicación 65, donde la proteína en cuestión tenga actividad fructosa-1,6 bifosfatasa (FBPasa).
- 67) Un vector de ADN según la reivindicación 65, donde la proteína en cuestión tenga actividad protoporfirinogeno oxidasa (PROTOX).
- 68) Un vector de ADN según la reivindicación 65, donde la proteína en cuestión tenga actividad ribulosa bifosfato carboxilasa (RUBISCO).
- 69) Un vector de ADN según la reivindicación 65, donde la proteína en cuestión participe directa o indirectamente en el proceso de fijación de carbono de la planta donde se exprese.

- 70) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para una proteína que contribuya a aumentar la conservación post-cosecha de los productos de la planta donde este se exprese.
- 5 71) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés alimentario codifique para una proteína que contribuya a mejorar la calidad nutricional de los productos de la planta donde este se exprese.
- 72) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para una citoquina.
- 10 73) Un vector de ADN según la reivindicación 72, donde la citoquina pertenezca a la familia de los interferones.
- 74) Un vector de ADN según la reivindicación 72, donde la citoquina pertenezca a la familia de las interleucinas.
- 75) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un polipéptido con actividad moduladora de la respuesta
15 inmune.
- 76) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un polipéptido con actividad hormonal.
- 77) Un vector de ADN según la reivindicación 76, donde el polipéptido con actividad hormonal sea la insulina.
- 20 78) Un vector de ADN según la reivindicación 76, donde el polipéptido con actividad hormonal sea una hormona de crecimiento.
- 79) Un vector de ADN según la reivindicación 76, donde el polipéptido con actividad hormonal sea una hormona somatotrópica.
- 80) Un vector de ADN según la reivindicación 76, donde el polipéptido con actividad
25 hormonal sea una hormona gonadotrópica.
- 81) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un factor de proliferación celular.
- 82) Un vector de ADN según la reivindicación 81, donde el factor de proliferación celular sea el factor de crecimiento epidérmico (EGF).
- 30 83) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un polipéptido con actividad hematopoyética.

- 84) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un receptor celular.
- 85) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un inhibidor de proteasas.
- 5 86) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un polipéptido con actividad trombolítica.
- 87) Un vector de ADN según la reivindicación 86, donde el polipéptido en cuestión es la estreptoquinasa.
- 88) Un vector de ADN según la reivindicación 86, donde el polipéptido en cuestión es el
10 activador tisular del plasminógeno (t-PA).
- 89) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un antígeno vacunal.
- 90) Un vector de ADN según la reivindicación 89, donde el antígeno vacunal pertenezca a un virus.
- 15 91) Un vector de ADN según la reivindicación 90, donde el antígeno vacunal pertenezca a un virus de hepatitis.
- 92) Un vector de ADN según la reivindicación 91, donde el antígeno vacunal sea el antígeno de superficie de la hepatitis B.
- 93) Un vector de ADN según la reivindicación 91, donde el antígeno vacunal pertenezca
20 al virus de la hepatitis A.
- 94) Un vector de ADN según la reivindicación 91, donde el antígeno vacunal pertenezca al virus de la hepatitis C.
- 95) Un vector de ADN según la reivindicación 90, donde el antígeno vacunal pertenezca al virus de la fiebre aftosa (FMDV).
- 25 96) Un vector de ADN según la reivindicación 90, donde el antígeno vacunal pertenezca al virus de inmunodeficiencia humana (HIV).
- 97) Un vector de ADN según la reivindicación 89, donde el antígeno vacunal pertenezca a una bacteria.
- 98) Un vector de ADN según la reivindicación 89, donde el antígeno vacunal pertenezca
30 a un protozooario.
- 99) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen en cuestión codifique para un fragmento de la región variable de una inmunoglobulina.

- 100) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen en cuestión codifique para una proteína multimérica.
- 101) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es una inmunoglobulina.
- 5 102) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es una hormona.
- 103) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es un antígeno vacunal.
- 104) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es una enzima.
- 10 105) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es un receptor celular.
- 106) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés industrial codifique para una proteína componente de un biopolímero.
- 15 107) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés industrial codifique para una enzima.
- 108) Un vector de ADN según la reivindicación 107, donde la enzima sea una proteasa.
- 109) Un vector de ADN según la reivindicación 107, donde la enzima sea una lipasa.
- 110) Un vector de ADN según la reivindicación 107, donde la enzima sea una isomerasa.
- 20 111) Un vector de ADN según la reivindicación 107, donde la enzima tenga actividad glicosil-hidrolasa.
- 112) Un vector de ADN según la reivindicación 111, donde la enzima con actividad glicosil-hidrolasa sea una levanasacarasa.
- 113) Un vector de ADN según la reivindicación 111, donde la enzima con actividad glicosil-hidrolasa sea una invertasa.
- 25 114) Un vector de ADN según la reivindicación 111, donde la enzima actividad glicosil-hidrolasa sea una levanasa.
- 115) Un vector de ADN según la reivindicación 111, donde la enzima actividad glicosil-hidrolasa sea una dextranasa.
- 30 116) El cultivo de las células vegetales en presencia de citoquininas, antes de introducirles cualesquiera de los vectores de ADN enunciados en las reivindicaciones de la 1 a la 115, para aumentar la frecuencia de producción de plantas transplastómicas.

- 117) El empleo de kinetina según la reivindicación 116.
- 118) Las plantas Angiospermas transplastómicas establemente transformadas con cualquiera de los vectores de ADN enunciados en las reivindicaciones de la 1 a la 115.
- 119) La progenie de las plantas transplastómicas de la reivindicación 118.
- 5 120) Las plantas transplastómicas según las reivindicaciones 118 y 119 que expresen establemente al menos uno de los genes presentes en el vector de ADN utilizado para la transformación.
- 121) Las plantas transplastómicas de las reivindicaciones 118 y 119 con las proteínas atpB y/o rbcL híbridas.
- 10 122) El cultivo de las plantas transplastómicas de la reivindicación 120.
- 123) El cultivo de las células de las plantas transplastómicas de la reivindicación 120.
- 124) La purificación y utilización de la proteína o proteínas que producen las células de las plantas de la reivindicación 120 como resultado de la expresión del gen o los genes en cuestión.
- 15 125) Las plantas transplastómicas de las reivindicaciones de la 118 a la 121 que sean Angiospermas.
- 126) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 125 que sean dicotiledóneas.
- 127) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 126 que sean solanáceas.
- 128) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 127 que pertenezcan a una de
- 20 las siguientes especies: tabaco, tomate o papa.
- 129) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 125 que sean monocotiledóneas.
- 130) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 129 que sean gramíneas.
- 131) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 130 que pertenezcan a una de
- 25 las siguientes especies: arroz, caña de azúcar, maíz, trigo o cebada.

Figura 1.

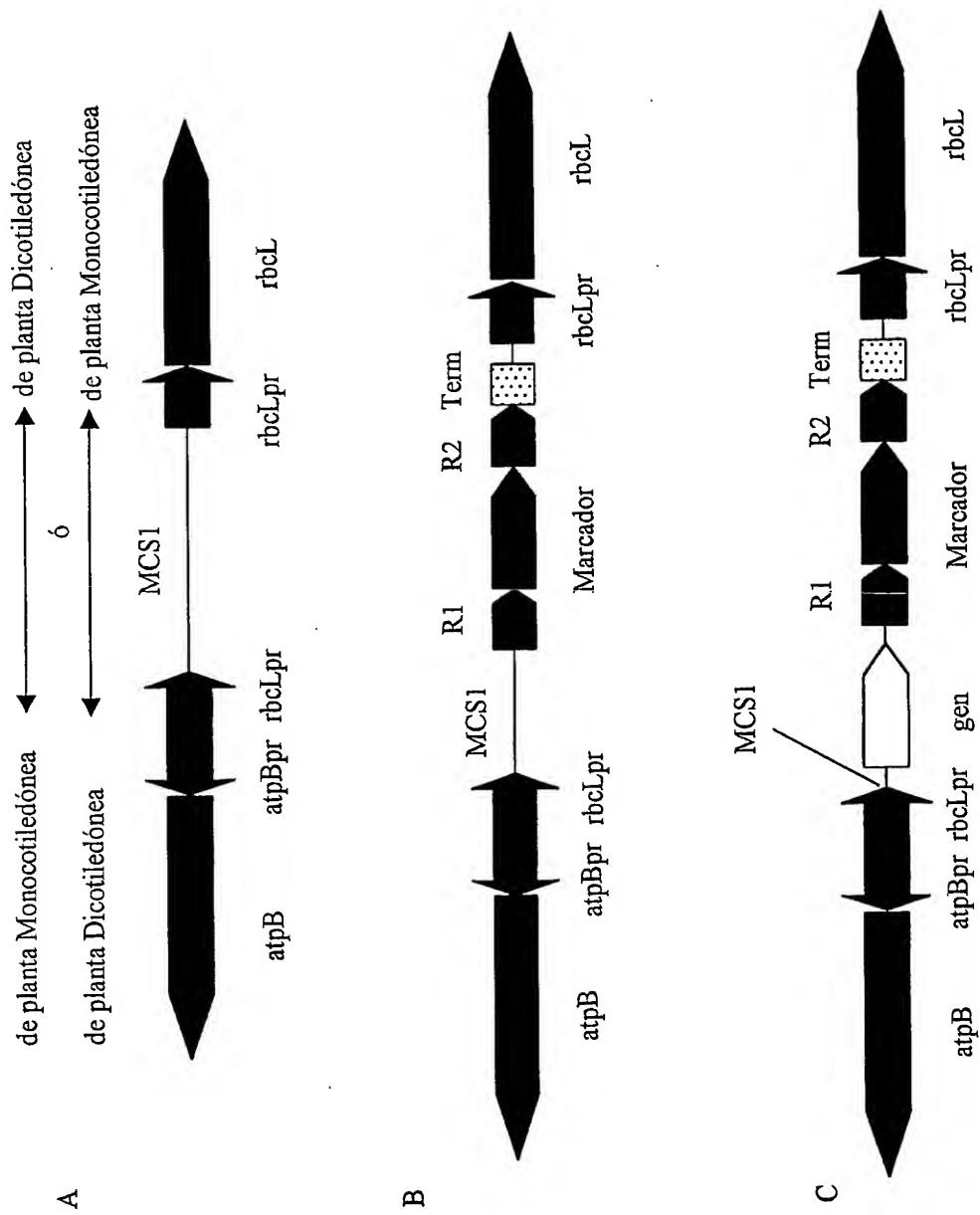


Figura 1 (Continuación)

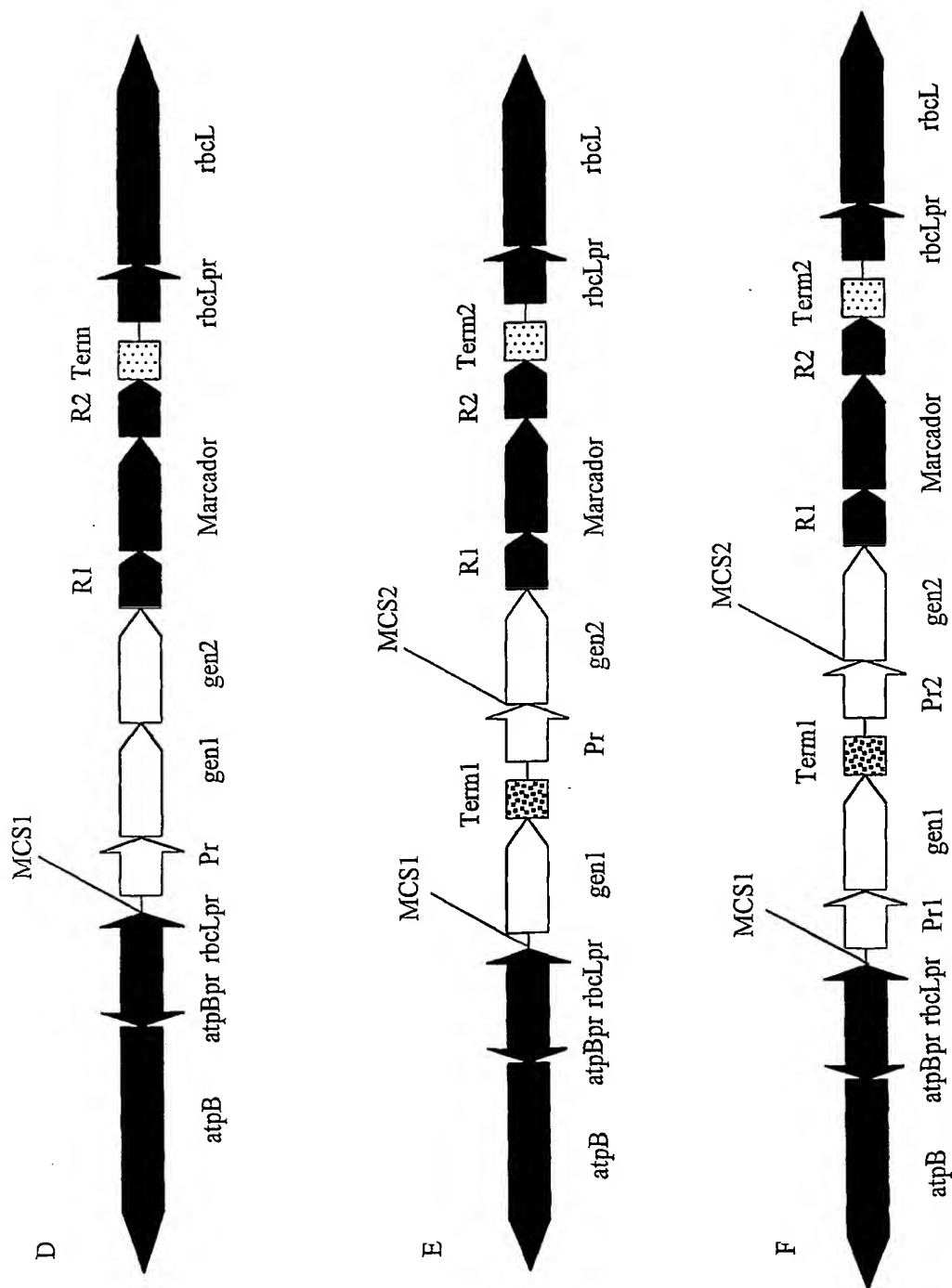
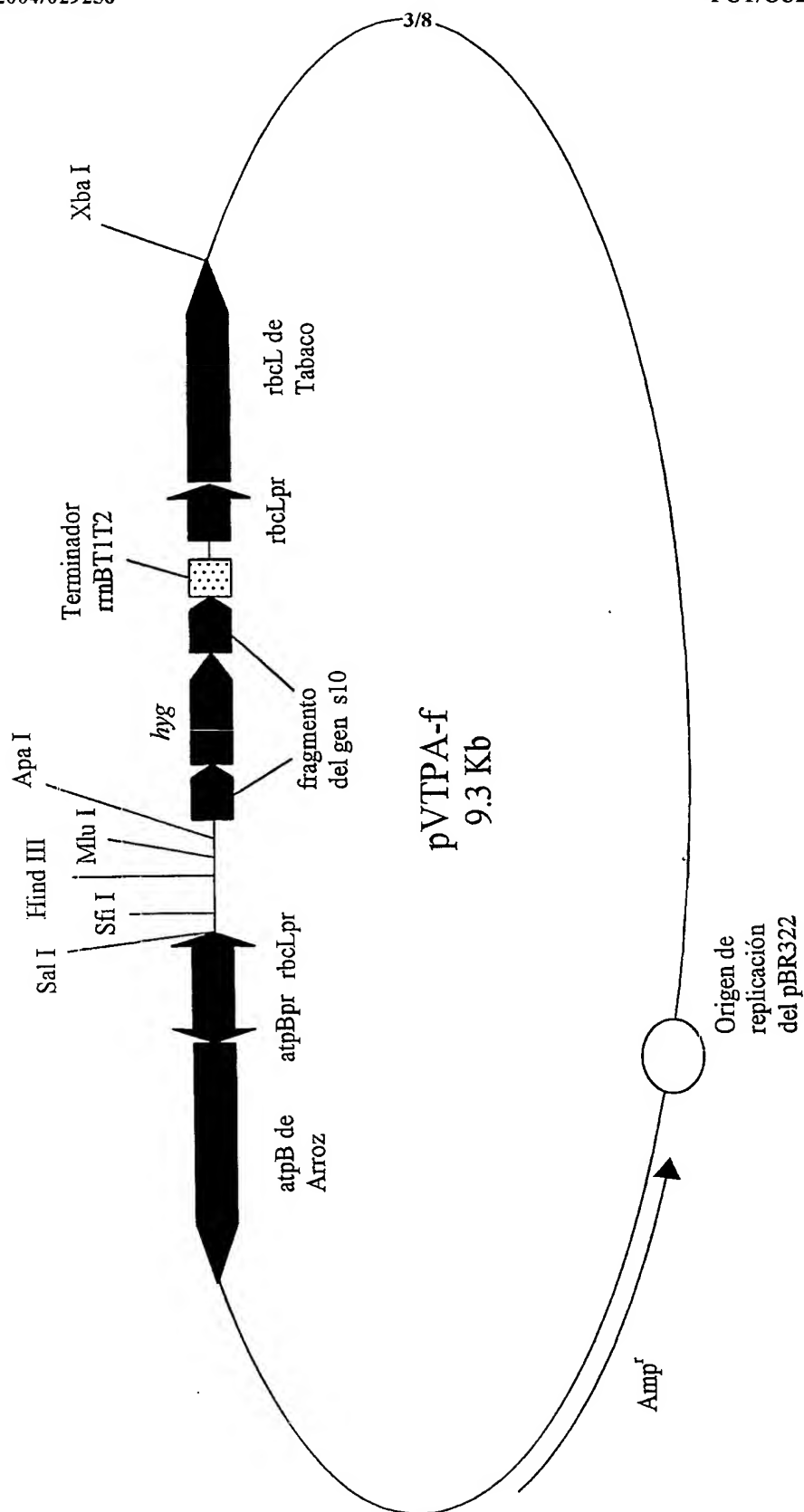
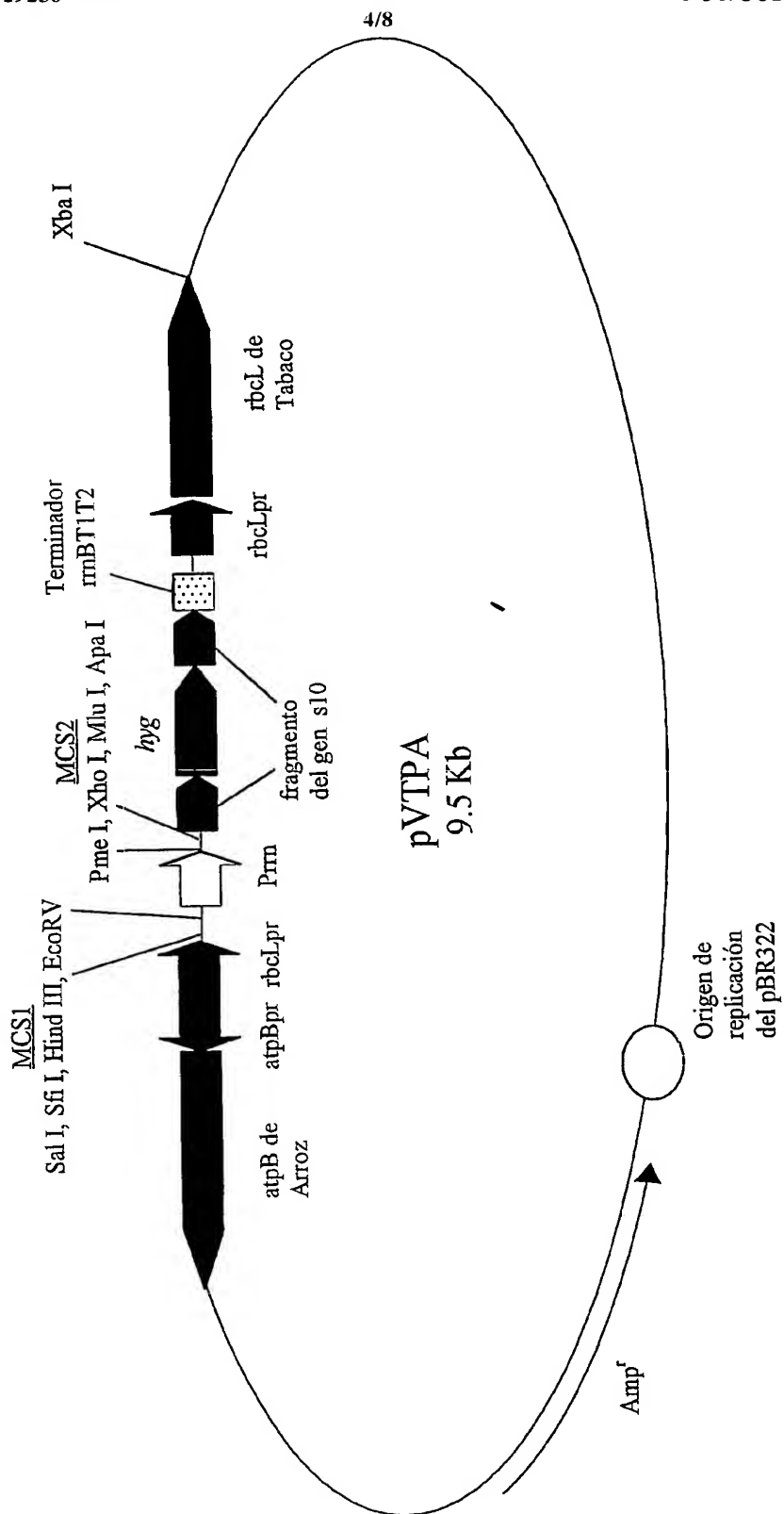


Figura 2.



4/8

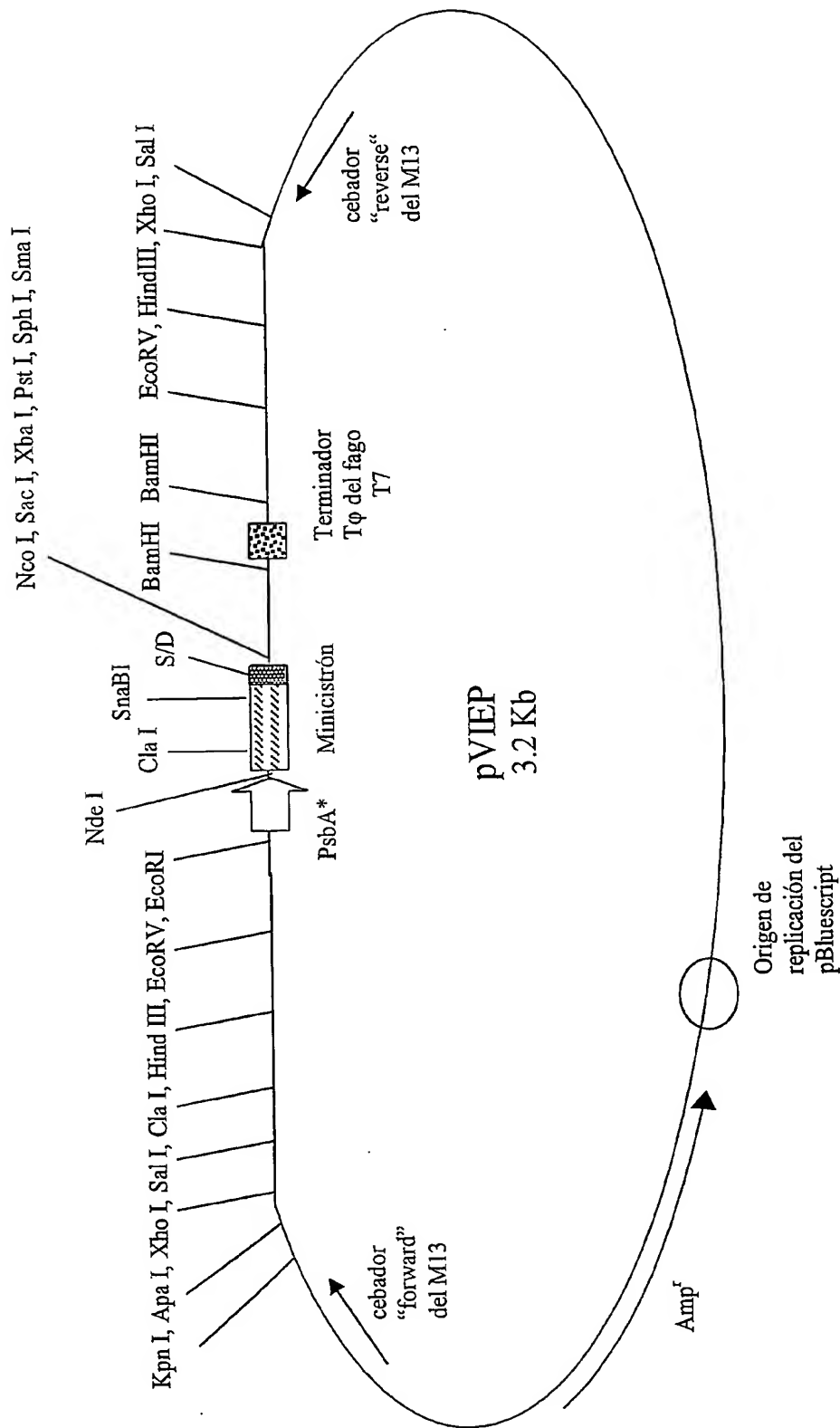


4/8

Figura 3.

27 048

Figura 4.



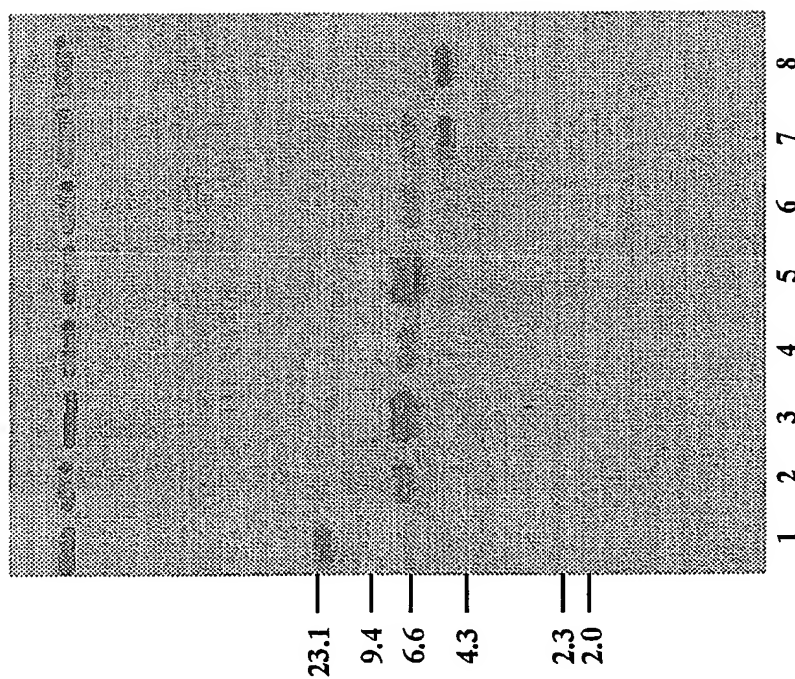


Figura 5.

Figura 6.

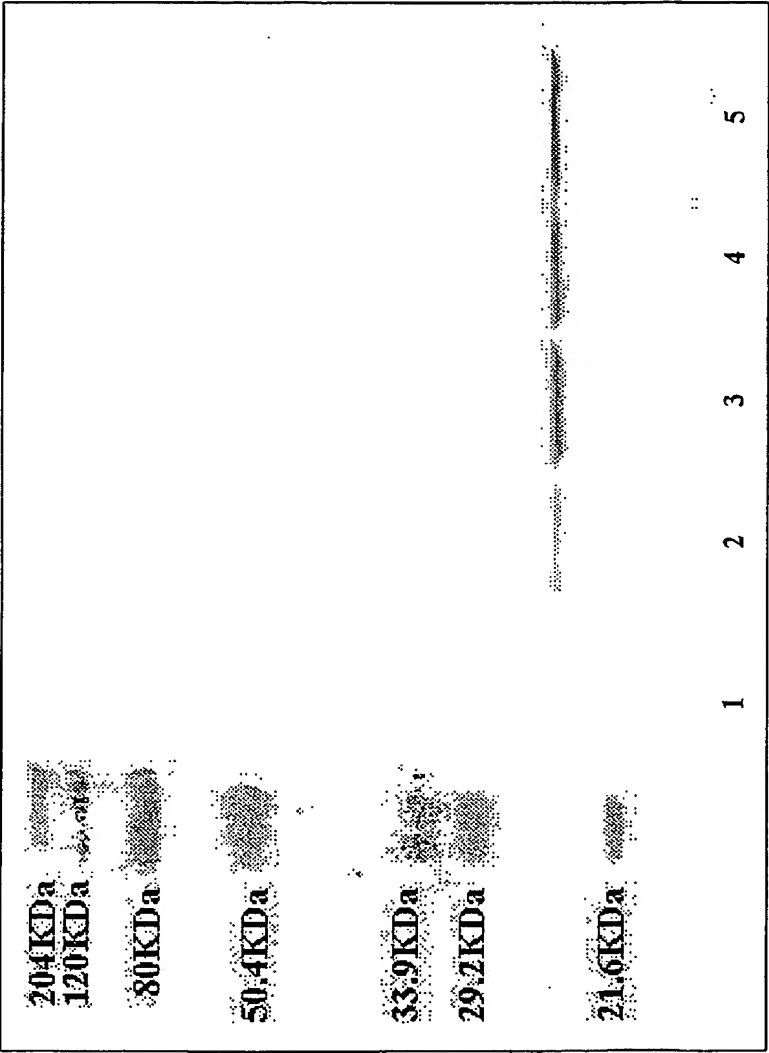
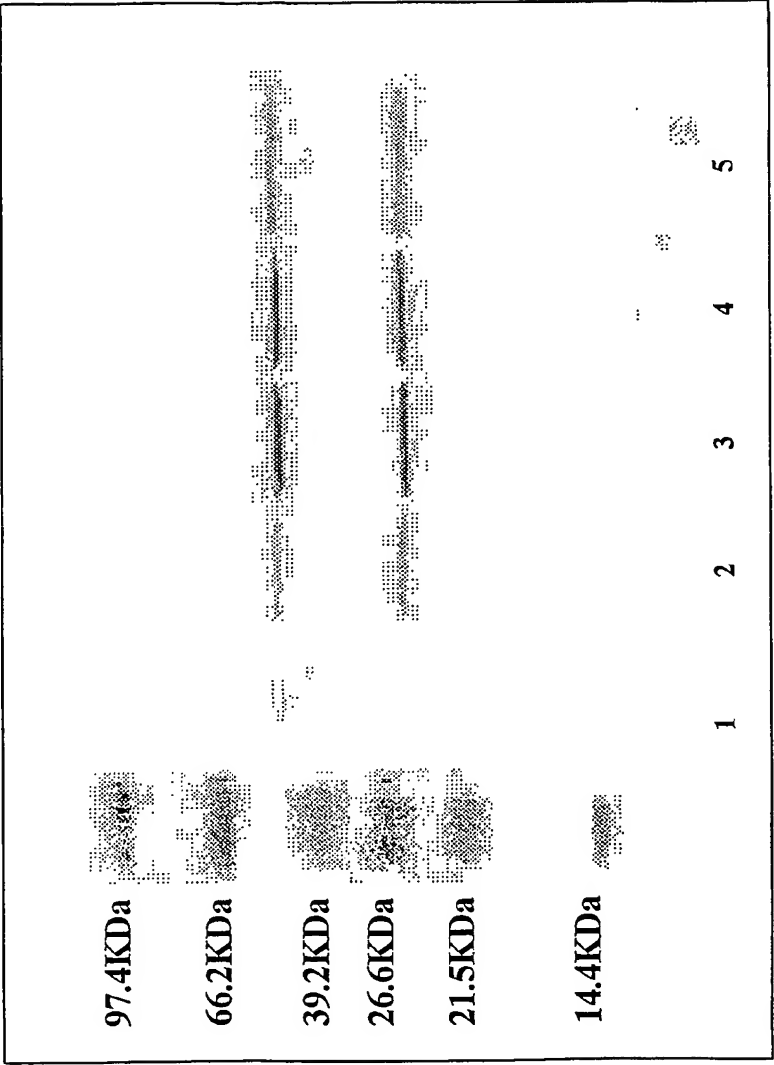


Figura 7.



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

5 <120> VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANGIOSPERMAS TRANSPLASTÓMICAS.

<130> Vector para plastidios de Angiospermas

<140> 0000

10 <141> 2002-08-05

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:

Oligonucleótido correspondiente a la región -291 a

-270 (a partir de inicio de traducción) del gen

25 que codifica para la rbcL de tabaco.

<400> 1

gggaagttct tattatttag g

21

30

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:

Oligonucleótido correspondiente a la región +1213

a +1233 (a partir de inicio de traducción) del gen

40 que codifica para la rbcL de tabaco.

<400> 2

ccaaggatgt cctaaagttc

20

45

<210> 3

<211> 133

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento

sintético de ADN correspondiente a la región -162

a -29 del líder no traducible del gen rbcL de

55 tabaco, con secuencia del lacO "ideal" insertada.

<400> 3

ccatgggtcta ataatcaaac attctgatta gttgataatt caaattgtga gcgctcaciaa 60

tttgaaagat tcctgtgaaa agtttcatta acacggaatt cgtgtcgagt agaccttgtt 120

60

gttgtgagaa ttc

133

<210> 4
<211> 1523
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
nucleotídica del borde-rbcL de tabaco.

<400> 4
gggaagttct tattatttag gttagtcagg tatttccatt tcaaaaaaaaa aaaaagtaaa 60
aaagaaaaat tgggttgccg tatatatatg aaagagtata caataatgat gtatttggca 120
15 aatcaaatac catggtctaa taatcaaaca ttctgattag ttgataattc aaattgtgag 180
cgctcacaat ttgaaagatt cctgtgaaaa gtttcattaa cacggaattc gtgtcgagta 240
gaccttggtg ttgtgagaat tcttaattca tgagttgtag ggagggattt atgtcaccac 300
aaacagagac taaagcaagt gttggattca aagctggtgt taaagagtac aaattgactt 360
attatactcc tgagtaccaa accaaggata ctgatatatt ggcagcattc cgagtaactc 420
20 ctcaacctgg agttccacct gaagaagcag gggccgcggt agctgccgaa tcttctactg 480
gtacatggac aactgtatgg accgatggac ttaccagcct tgatcgttac aaagggcgat 540
gctaccgcat cgagcgtggt gttggagaaa aagatcaata tattgcttat gtagcttacc 600
ctttagacct ttttgaagaa ggttctgtta ccaacatggt tacttccatt gtaggtaacg 660
tatttggggt caaagccctg cgcgctctac gtctggaaga tctgcgaatc cctcctgctt 720
25 atgttaaaac tttccaaggt ccgcctcatg ggatccaagt tgaaagagat aaattgaaca 780
agtatggctg tcccctgttg ggatgtacta ttaaacctaa attgggggtta tctgctaaaa 840
actacggtag agccgtttat gaatgtcttc gcggtggact tgattttact aaagatgatg 900
agaacgtgaa ctcaacaacca tttatgcgtt ggagagatcg tttcttattt tgtgccgaag 960
cactttataa agcacaggct gaaacagggt aaatcaaagg gcattacttg aatgctactg 1020
30 caggtacatg cgaagaaatg atcaaaagag ctgtatttgc tagagaattg ggcgttccga 1080
tcgtaatgca tgactactta acggggggat tcaccgcaaa tactagcttg gctcattatt 1140
gccgagataa tgggtctactt cttcacatcc accgtgcaat gcatgcggtt attgatagac 1200
agaagaatca tggatccac ttccgggtat tagcaaaagc gttacgtatg tctgggtggag 1260
atcatattca ctctggtacc gtagtaggta aacttgaagg tgaaagagac ataactttgg 1320
35 gctttgttga tttactgcgt gatgattttg ttgaacaaga tcgaagtcgc ggtattttatt 1380
tcactcaaga ttgggtctct ttaccagggt ttctaccgt ggcttcagga ggtattcacg 1440
tttggcatat gcctgctctg accgagatct ttggggatga ttccgtacta cagttcgggtg 1500
gaggaacttt aggacatcct tgg 1523

40 <210> 5
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
Oligonucleótido correspondiente a la región -543 a
50 -519 (a partir de inicio de traducción) del gen
que codifica para la atpB de arroz.

<400> 5
gacttgagtt gttgttattg taag

24

55 <210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
Oligonucleótido correspondiente a la región +1188
a +1211 (a partir de inicio de traducción) del
gen que codifica para la atpB de arroz.

5

<400> 6
atgtcctgaa gttctttgta acg

23

10

<210> 7
<211> 132
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento
sintético de ADN correspondiente a la región -654
a -543 del líder no traducible del gen atpB de
arroz, más sitios de restricción adicionados.

20

<400> 7
aagcttggcc aaaaaggccg tcgacaaaat ggggggcatg cttaagttaa tgaatatgtt 60
tcattcatat aatatgtttc attcatatat aatgggtaca ccctgtgtac attctatgct 120
ataggaattc at 132

25

<210> 8
<211> 1887
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
nucleotídica del borde-atpB de arroz.

35

<400> 8
aagcttggcc aaaaaggccg tcgacaaaat ggggggcatg cttaagttaa tgaatatgtt 60
tcattcatat aatatgtttc attcatatat aatgggtaca ccctgtgtac attctatgct 120
ataggaattc attcgacttg agttgttggt attgtaagtt aacatgcttc gattattaaa 180
ccatggattt gattcaccaa atccatcttt attgtatact ctttaataga tatagcgcaa 240
cccaaatca acttctaact cttattaagt tcttaataga ccccttttct ttattttgag 300
tggaataacc taaatactac gaaaattctc tgttgacagc aatctatgct tcacagtagt 360
atatattttg tatatcgaag tcctagataa gaaagtagag taggcacaaa tcgtttacaa 420
aaggcaaaat gtatatgaaa aaaagattga ttgaactttc cgacggactc attccatgag 480
taaacgattg aatgggattc gtttgggcaa cgaaatcaag tgctgggtccc cttttctctc 540
ttattgaatt aactaattca tttccttttg acttttggat ttttggatat ttttttgggtg 600
ttgatttggc attattcaac aagaaaaaaa tcaaaatttc gataaattcc ttttttttga 660
aaattatgtg ataattatga gaaccaatcc tactacttct cgtcccgggg tttctacaat 720
tgaagaaaaa agtacagggc gtatcgatca aattattgga ccctgtctgg atgtcacttt 780
tccccggggc aagttacctt atattttataa tgcttttgta gtcaagagtc gagacactga 840
cggttaagcaa attaatgtaa cttgtgaggt acaacaatta ttaggaaata atcgagttag 900
agctgtagct atgagtgtca cagatgggtt gatgagagga atggaagtga ttgacacggg 960
agctcctctc agtgttctctg tcggtggagc tactcttgga cgaattttca acgttcttgg 1020
ggagcctgtt gacaatttgg gtcctgtaga tactagtga acattcccta ttcataagatc 1080
cgcgcccgcc tttatcgagt tagatacgaa attatccatc tttgaaactg gtattaaggt 1140
ggtcgatctt ttagctcctt atcggcgttg aggaaaaatc ggactatttg ggggagctgg 1200
agtaggtaaa acagtactca tcattgaatt aatcaacaat attgctaaag ctcacggggg 1260
cgtatccgta tttggcggag taggggaacg gactcgtgaa ggaaatgatc tttatatgga 1320
aatgaaggaa tctggagtaa ttaatgaaaa aaatcttgag gaatcaaagg tagctctagt 1380
ctatggccaa atgaatgaac cgccaggagc tcgtatgaga gttgggtttga ctgccctaac 1440
tatggcagaa tatttccgag atgttaataa gcaagacgtg cttctattca tcgataatat 1500

60

ctttcgtttt gttcaagcag gatcggaggt atctgcctta ttagggagaa tgccctctgc 1560
 agtgggttat caacctactc ttagtacaga aatgggttct ttgcaagaaa gaattacttc 1620
 tactaaaaag ggatctataa cttcgatcca agcgggttat gtacctgcgg acgatttgac 1680
 cgacctgct cctgctacaa catttgcaca tttggatgct actaccgtac ttccagagg 1740
 5 attagcttcc aaagggattt atcctgcagt agatccttta gattcaacct caactatgtt 1800
 acaacctcgg atcgttggca acgaacatta tgaaactgca caaagagtta agcaaacttt 1860
 acaacgttac aaagaacttc aggacat 1887

10 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 Oligonucleótido empleado para amplificar el gen
 hgh (con secuencia tipo Shine-Dalgarno
 incorporada).

20 <400> 9
 gggaggaatg agatatgaaa aagc 24

25 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 Oligonucleótido empleado para amplificar el gen
 hgh.

35 <400> 10
 gtcggtacct actctatttc ttg 24

40 <210> 11
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento
 sintético de ADN con sitios de clonaje HindIII,
 MluI, ApaI, SmaI y BglII, necesarios para la
 construcción del casete de selección con el gen
 hgh.

50 <400> 11
 aagcttgatt cgagtgaacg cgtatagggc ccgggagatc t 41

55 <210> 12
 <211> 2223
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia

nucleotídica del fragmento de ADN con el casete de
selección con bordes repetidos
(linker-spacer-Hyg-spacer-rnT1T2) clonado en el
pBluescript.

5

```

<400> 12
aagcttgatt cgagtgaacg cgtatagggc ccaattcgag ctcggtacca gcaccaccag 60
cgggtgaggtg cggaacttct acaacctcaa agcccataac gttgcggata gaacccttct 120
caggggtcaat cagagcagcg tagtttgctg cggttcggcat cagtgtctgcc agaatcgcag 180
10 agtagctatc tgggtcacag tagaacacac ggtcagcagc cggaacatag ttcttgggtca 240
gagccgcacg agccttagtc agagccgcaa taatctcctt acccagcgca acttgggtcgg 300
tcaagtgcgg ccttggtctg agtgggtctca attacggtag cagtaccta gcccctcgggg 360
gatctgggga ggaatgagat atgaaaaagc ctgaactcac cgcgacgtct gtcgagaagt 420
ttctgatcga aaagtctgac agcgtctccg acctgatgca gctctcggag ggcgaagaat 480
15 ctctgtgcttt cagcttcgat gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgcg 540
ccgatggttt ctacaaaagat cgttatgttt atcggcactt tgcacgcggc gcgctcccga 600
ttccggaaagt gcttgacatt ggggagttta gcgagagcct gacctattgc atctcccgcc 660
gtgcacaggg tgtcacgttg caagacctgc ctgaaaccga actgcccgtt gttctacaac 720
cgggtgcggga ggctatggat gcgatcgctg cggccgatct tagccagacg agcggggttcg 780
20 gccatttcgg accgcaagga atcgggtcaat acactacatg gcgtgatttc atatgcgcga 840
ttgctgatcc ccatgtgtat cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgctcg 900
tcgcgcaggc tctcgatgag ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc 960
tcgtgcacgc ggatttcggc tccaacaatg tctgacgga caatggccgc ataacagcgg 1020
tcattgactg gagcgaggcg atgttcgggg attcccaata cgaggtcgcg aacatcttct 1080
25 tctggaggcc gtggttggct tgtatggagc agcagacgcg ctacttcgag cggaggcatc 1140
cggagcttgc aggatcgcca cgactccggg cgtatatgct ccgcatttgt cttgaccaac 1200
tctatcagag cttggttgac ggcaatttcg atgatgcagc ttgggcgcag ggtcgatgcg 1260
acgcaatcgt ccgatccgga gccgggactg tcgggcgtac acaaatcgcc cgcagaagcg 1320
cggccgtctg gaccgatggc tgtgtagaag tactcgccga tagtggaac cgacgcccc 1380
30 gactcgtcc gagggcaag aaatagagta ggtaccagca ccaccagcgg tgagggtgcg 1440
aacttctaca acctcaaagc ccataacgtt gcgtagaag cccttctcag ggtcaatcag 1500
agcagcgtag tttgctgctg tcggcatcag tgctgccaga atcgagagt agctatctgg 1560
gtcacagtag aacacacggt cagcagccgg aacatagttc ttggtcagag ccgcacgagc 1620
cttagtcaga gccgcaataa tctccttacc cagcgcaact tggtcggtaa gtgcggcctt 1680
35 gttctgagtg gtctcaatta cggtagcagt acctaaagccc tcgggggatc agcttggctg 1740
ttttggcgga tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg 1800
tctgataaaa cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtcccacctg accccatgcc 1860
gaactcagaa gtgaaacgcc gtagcgccga tggtagtgtg ggggtctccc atgcgagagt 1920
agggaaactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggtcagtc gaaagactgg gcctttcggt 1980
40 ttatctgttg tttgtcggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccc ggagcggatt 2040
tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggt ggcgggcagg acgcccgcga taaactgcc 2100
ggcatcaaat taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcggtt ctacaaactc 2160
tttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctgggggatc cactagttct 2220
aga 2223

```

45

<210> 13

<211> 5669

<212> ADN

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
nucleotídica de un fragmento de ADN del vector
pVTPA-f entre los bordes atpB de arroz y rbcL de
tabaco.

55

<400> 13

60

```

gtcgaggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cgttgtaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
gtttcataat gttcggtgcc aacgatccga ggttgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
ggatctactg caggataaat ccctttggaa gctaatectc tggaaagtac ggtagtagca 180

```

	tccaaatgtg	caaatgttgt	agcaggagca	gggtcgggtca	aatcgtccgc	aggtacataa	240
	accgcttgga	tcgaagttat	agatcccttt	ttagtagaag	taattctttc	ttgcaaagaa	300
	cccatctctg	tactaaagag	aggttgataa	cccactgcag	agggcattct	ccctaataag	360
5	gcagatacct	ccgatccctgc	ttgaacaaaa	cgaaagatat	tatcgatgaa	tagaagcacg	420
	tcttgcttat	taacatctcg	gaaatattct	gccatagtta	gggcagtcaa	accaactctc	480
	atacagagtc	ctggcggttc	attcattttg	ccatagacta	gagctacctt	tgattcctca	540
	agattttttt	cattaattac	tccagattcc	ttcattttcca	tataaagatc	atttccttca	600
	cgagtccggt	cccctactcc	gccaaatacg	gatacgcccc	cgtgagcttt	agcaatattg	660
	ttgattaatt	ccatgatgag	tactgtttta	cctactccag	ctcccccaa	tagtccgatt	720
10	tttccctccac	gccgataagg	agctaaaaga	tcgaccacct	taataccagt	ttcaaagatg	780
	gataaatttcg	tatctaactc	gataaaggcg	ggcgcggtatc	tatgaatagg	gaatgttgca	840
	ctagtatcta	caggacccaa	attgtcaaca	ggctcccca	gaacgttgaa	aattcgtcca	900
	agagtagctc	caccgacagg	aacactgaga	ggagctcccg	tgtcaatcac	ttccattcct	960
	ctcatcaacc	catctgtagc	actcatagct	acagctctaa	ctcgattatt	tcctaataat	1020
15	tggtgtacct	cacaagttac	attaattttg	ttaccgtcag	tgtctcgact	cttgactacc	1080
	aaagcattat	aaatataagg	taactttgcc	gggggaaaag	tgacatccag	cacgggtcca	1140
	ataaattgat	cgatacgccc	tgtacttttt	tcttcaattg	tagaaacccc	gggacgagaa	1200
	gtagtaggat	tggttctcat	aattatcaca	taattttcaa	aaaaaaggaa	tttatcgaaa	1260
	ttttgatttt	tttcttgttg	aataatgcc	aatcaacacc	aaaaaaatat	ccaaaaatcc	1320
20	aaaagtcaaa	aggaaatgaa	ttagttaatt	caataagaga	gaaaagggga	ccagcacttg	1380
	atttcgtttg	ccaaacgaat	cccattcaat	cgtttactca	tggaatgagt	ccgtcggaaa	1440
	gttcaatcaa	tctttttttc	atatacattt	tgccttttgt	aaacgatttg	tgcctactct	1500
	actttcttat	ctaggacttc	gatatacaaa	atatatacta	ctgtgaagca	tagattgctg	1560
25	tcaacagaga	attttcgtag	tatttaggta	tttccactca	aaataagaaa	aggggggtcta	1620
	ttaagaactt	aataaggatt	agaagttgat	ttgggggttg	gctatatcta	ttaaagagta	1680
	tacaataaag	atggatttgg	tgaatcaaat	ccatgggtta	ataatcgaag	catgtttaact	1740
	tacaataaca	acaactcaag	tccaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acagggtgta	1800
	cccattatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
	ccccccattt	tgtcgacggc	cttttttgcc	aagcttgatt	cgagtgaacg	cgtatagggc	1920
30	ccaattcgag	ctcggtagca	gcaccaccag	cggtaggggtg	cggaacttct	acaacctcaa	1980
	agcccataac	ggttgcggata	gaacccttct	cagggtcaat	cagagcagcg	tagtttgctg	2040
	cgttcggcat	cagtgcctgc	agaatcgag	agttagctatc	tgggtcacag	tagaacacac	2100
	ggtcagcagc	cggaacatag	ttcttggtca	gagccgcacg	agccttagtc	agagccgcaa	2160
	taatctcctt	accagcgca	acttggtcgg	tcaagtgcgg	ccttggtctg	agtgggtctca	2220
35	attacggtag	cagtacctaa	gccctcgggg	gatctgggga	ggaatgagat	atgaaaaagc	2280
	ctgaactcac	cgcgacgtct	gtcgaagaat	cttctgacga	aaagttcgac	agcgtctccg	2340
	acctgatgca	gctctcgag	ggcgaagaat	ctcgtgcttt	cagcttcgat	gtaggaggggc	2400
	gtggatatgt	cctgctgggt	aatagctgcg	ccgatgggtt	ctacaaagat	cgttatgttt	2460
	atcggcaatt	tgcacggtc	gcgctcccg	ttccggaagt	gcttgacatt	ggggagttta	2520
40	gcgagagcct	gacctattgc	atctcccgc	gtgcacaggg	tgtcacgttg	caagacctgc	2580
	ctgaaaccga	actgcccgt	gttctacaac	cggctcgcca	ggctatggat	gcgatcgctg	2640
	cgcccgatct	tagccagacg	agcgggttcg	gcccatccgg	accgcaagga	atcgggtcaat	2700
	acactacatg	gcgtgatttc	atatgcgcga	ttgctgatcc	ccatgtgtat	cactggcaaa	2760
	ctgtgatgga	cgacaccgtc	agtgcgtccg	tcgcgcaggc	tctcgatgag	ctgatgcttt	2820
45	gggccgagga	ctgccccgaa	gtccggcacc	tcgtgcacgc	ggatttcggc	tccaacaatg	2880
	tcttgacgga	caatggccgc	ataacagcgg	tcattgactg	gagcgaggcg	atgttcgggg	2940
	attcccaata	cgaggtcgcc	aacatcttct	tctggaggcc	gtgggtggct	tgtatggagc	3000
	agcagacgcg	ctacttcgag	cggaggcatc	cggagcttgc	aggatcgcca	cgactccggg	3060
	cgtatatgct	ccgcattggt	cttgaccaac	tctatcagag	cttggttgac	ggcaatttcg	3120
50	atgatgcagc	ttgggcgcag	ggtcgatgcg	acgcaatcgt	ccgatccgga	gccgggactg	3180
	tcgggcgtac	acaaatcgcc	cgcagaagcg	cggccgtctg	gaccgatggc	tgtgtagaag	3240
	tactcgccga	tagtggaac	cgacgcccc	gcactcgtcc	gagggcaaa	aaatagagta	3300
	ggtaccagca	ccaccagcgg	tgaggtgcgg	aacttctaca	acctcaaagc	ccataacggt	3360
	gcggatagaa	cccttctcag	ggtcaatcag	agcagcgtag	tttgctgcgt	tcggcatcag	3420
55	tgctgccaga	atcgagaggt	agctatctgg	gtcacagtag	aacacacggt	cagcagccgg	3480
	aacatagttc	ttgggtcagag	ccgcacgagc	cttagtcaga	gcccgaataa	tctccttacc	3540
	cagcgcaact	tggtcggtaa	gtgcggcctt	tgtctgagtg	gtctcaatta	cggtagcagt	3600
	acctaagccc	tcgggggatc	agcttggctg	ttttggcgga	tgagagaaga	ttttcagcct	3660
	gatacagatt	aaatcagaac	gcagaagcgg	tctgataaaa	cagaatttgc	ctggcgccag	3720
60	tagcgcggtg	gtcccacctg	accccatgcc	gaactcagaa	gtgaaacgcc	gtagcgccga	3780
	tggtagtgtg	gggtctcccc	atgcgagagt	agggaactgc	caggcatcaa	ataaaacgaa	3840

```

aggctcagtc gaaagactgg gcctttcggtt ttatctggtg tttgtcgggtg aacgctctcc 3900
tgagtaggac aaatccgccc ggagcgggatt tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggt 3960
ggcgggcagg acgcccgcga taaactgccca ggcatcaaat taagcagaag gccatcctga 4020
cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc tttttgttta tttttctaaa tacattcaaa 4080
5  tatgtatccg ctgggggatc agcttgatgg ccgccagtgt gatggatggg aagttcttat 4140
tatttaggtt agtcaggat ttccatttca aaaaaaaaaa aagtaaaaaa gaaaaattgg 4200
gttgcgctat atatatgaaa gagtatacaa taatgatgta tttggcaaata caaataccat 4260
ggctctaataa tcaaacattc tgattagttg ataattcaaa ttgtgagcgc tcacaatttg 4320
aaagattcct gtgaaaagtt tcattaacac ggaattcgtg tcgagtagac cttgttggtg 4380
10  tgagaattct taattcatga gttgtaggga gggatttatg tcaccacaaa cagagactaa 4440
agcaagtgtt ggattcaaaag ctggtgttaa agagtacaaa ttgacttatt atactcctga 4500
gtaccaaacc aaggatactg atatatggc agcattccga gtaactcctc aacctggagt 4560
tccacctgaa gaagcagggg ccgcggttagc tgccgaatct tctactggta catggacaac 4620
tgtatggacc gatggactta ccagccttga tcgttacaaa gggcgatgct accgcatcga 4680
15  gcgtgttggt ggagaaaaag atcaatatat tgcttatgta gcttaccctt tagacctttt 4740
tgaagaaggt tctgtttacca acatgtttac ttccattgta ggtaacgtat ttgggttcaa 4800
agccctgcgc gctctacgtc tggaagatct gcgaatccct cctgcttatg ttaaaacttt 4860
ccaaggtccg cctcatggga tccaagtga aagagataaa ttgaacaagt atggtcgtcc 4920
cctgtttgga tgtactatta aacctaaatt ggggttatct gctaaaaact acggtagagc 4980
20  cgtttatgaa tgtcttcgcg gtggacttga ttttactaaa gatgatgaga acgtgaactc 5040
acaaccattt atgcgttgga gagatcgttt cttattttgt gccgaagcac tttataaagc 5100
acaggctgaa acaggtgaaa tcaaagggca ttacttgaat gctactgcag gtacatgcga 5160
agaaatgatc aaaagagctg tatttgctag agaattgggc gttccgatcg taatgcatga 5220
ctacttaacg gggggattca ccgcaaatac tagcttggct cattattgcc gagataatgg 5280
25  tctacttctt cacatccacc gtgcaatgca tgccggttatt gatagacaga agaatcatgg 5340
tatccatttc cgggtattag caaaagcgtt acgtatgtct ggtggagatc atattcactc 5400
tggtaccgta gtaggtaaac ttgaaggtga aagagacata actttgggct ttgttgattt 5460
actgcgtgat gattttggtg aacaagatcg aagtcgcggt atttatttca ctcaagattg 5520
ggctctctta ccaggtgttc taccctgtgc ttcaggaggt attcacgttt ggcatatgcc 5580
30  tgctctgacc gagatctttg gggatgattc cgtactacag ttcggtggag gaactttagg 5640
acatccttgg atctgcagct agttctaga 5669

```

<210> 14

<211> 176

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento sintético de ADN que codifica para la región promotora de la subunidad 16S del RNA ribosomal plastídico (Prn) con sitios de restricción adicionados.

<400> 14

```

gaattccccc gggctgctcc ccgcgcgtcg ttcaatgaga atggataaga ggctcgtggg 60
attgacgtga gggggcaggg atggctatat ttctgggagc gaactccggg cgaatacgaa 120
gcgcttggat acagttgtag ggagggattt catcgtttaa actcgagtga acgcgt 176

```

<210> 15

<211> 5834

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN del vector pVTPA entre los bordes atpB de arroz y rbcL de tabaco.

<400> 15
5 gtcgagggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cgttgtaaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
gtttcataat gttcgttgcc aacgatccga gggtgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
ggatctactg caggataaat ccctttggaa gctaactctc tggaaagtac ggtagtagca 180
tccaaatgtg caaatgttgt agcaggagca gggtcgggtca aatcgccgc aggtacataa 240
accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
cccatttctg tactaagagt aggttgataa cccactgcag agggcattct ccctaataag 360
10 gcagatacc tccgatctgc ttgaacaaaa cgaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
tcttgcttat taacatctcg gaaatattct cccatagtta gggcagtcaa accaactctc 480
atacgagctc ctggcgggttc attcatttgg ccatagacta gagctacctt tgattcctca 540
agattttttt catttaattac tccagattcc ttcatttcca tataaagatc atttccttca 600
cgagtcggtt ccctactcc gccaaatacg gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
ttgattaatt ccatgatgag tactgtttta cctactccag ctcccccata tagtccgatt 720
15 tttcctccac gccgataagg agctaaacct tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
gataatttctg tatctaactc gataaaggcg ggccgggcatc tatgaatagg gaatgttgca 840
ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggctcccccga gaacgttgaa aattcgtcca 900
agagtagctc caccgacagg aacactgaga ggagctcccg tgtcaatcac ttccattcct 960
ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020
20 tgttgtaacct cacaagttac attaatttgc ttaccgtcag tgtctcgact cttgactacc 1080
aaagcattat aaataaagg taacttgccc gggggaaaaag tgacatccag cacgggtcca 1140
ataatttgat cgatacgccc tgtacttttt tcttcaattg tagaaacccc gggacgagaa 1200
gtagtaggat tggttctcat aattatcaca taattttcaa aaaaaaggaa tttatcgaaa 1260
ttttgatttt tttcttggtg aataatgcc aatcaacacc aaaaaatat ccaaaaatcc 1320
25 aaaagtcaaa aggaaatgaa ttagtttaatt caataagaga gaaaagggga ccagcacttg 1380
atttcgttgc ccaaacgaat cccattcaat cgtttactca tggaaatgagt ccgtcggaaa 1440
gttcaatcaa tctttttttc atatacattt tgcttttgt aaacgatttg tgcctactct 1500
actttcttat ctaggacttc gatatacaaa atataacta ctgtgaagca tagatttgctg 1560
tcaacagaga attttcgtag tatttaggta ttccactca aaataagaaa aggggggtcta 1620
30 ttaagaactt aataaggatt agaagttgat ttgggggttg gctatatcta ttaaagagta 1680
tacaataaag atggatttgg tgaatcaaat ccatggttta ataatcgaag catgttaact 1740
tacaataaca acaactcaag tcgaatgaat tcctatagca tagaatgtac acagggtgta 1800
cccattatat atgaatgaaa catattatat gaatgaaaca tattcattaa cttaagcatg 1860
ccccccattt tgtcgacggc ctttttggcc aagcttgata tcgaattccc ccgggctgct 1920
35 ccccgccgtt cgttcaatga gaattggata gaggtcgtg ggattgacgt gagggggcag 1980
ggatggctat atttctggga gcgaactccg ggcgaatacg aagcgttg gacagttgt 2040
agggagggat ttcatcgttt aaactcgagt gaacgcgtat agggcccaat tcgagctcgg 2100
taccagcacc accagcgggt aggtgcggaa cttctacaac ctcaaagccc ataacgttgc 2160
ggatagaacc cttctcagggt tcaatcagag cagcgtagtt tgctgcgttc ggcatcagtg 2220
40 ctgccagaat cgagagtag ctatctgggt cacagtagaa cacacggta gcagccgaa 2280
catagttctt gtcagagcc gcacgagcct tagtcagagc cgcaataatc tcttaccaca 2340
gcgcaacttg gtcggtcaag tgccggccttg ttctgagtg tctcaattac ggtagcagta 2400
cctaagccct cgggggatct ggggaggaat gagatatgaa aaagcctgaa ctcccgcgga 2460
cgtctgtcga gaagtttctg atcgaaaagt tcgacagcgt ctccgacctg atgcagctct 2520
45 cggagggcga agaactctgt gctttcagct tcgatgtagg agggcgtgga tatgtcctgc 2580
gggtaaaatg ctgcgccgat ggtttctaca aagatcgtta tgtttatcgg cactttgcat 2640
cggccgcgct cccgattccg gaagtgcctg acattgggga gtttagcgag agcctgacct 2700
attgcattct ccgccgtgca cagggtgtca cgttgcaaga cctgcctgaa accgaactgc 2760
ccgctgttct acaaccgggt gcggaggcta tggatgcgat cgctgcggcc gatcttagcc 2820
50 agacgagcgg gttcggccca ttccgaccgc aaggaatcgg tcaatacact acatggcgtg 2880
atttcatatg cgcgatttgc gatccccatg tgtatcactg gcaaaactgt atggacgaca 2940
ccgtcagtg cgtccgtcgc caggctctcg atgagctgat gctttgggccc gaggactgcc 3000
ccgaagtccg gcacctcgtg cacgcggatt tcggctccaa caatgtcctg acggacaatg 3060
gccgcataac agcgttcatt gactggagcg agcgatggt cggggattcc caatacgagg 3120
55 tcgccaaacat cttcttcttg aggcctgggt tggcttgat ggagcagcag acgcgtact 3180
tcgagcggag gcatccggag cttgcaggat gcgcacgact ccgggcgtat atgctccgca 3240
ttggctctga ccaactctat cagagcttgg ttgacggcaa tttcgatgat gcagcttggg 3300
cgcagggtcg atgcgacgca atcgtccgat ccggagccgg gactgtcggg cgtacacaaa 3360
tcgcccgcag aagcgcggcc gtctggaccg atggctgtgt agaagtactc gccgatagtg 3420
60 gaaaccgacg ccccgacact cgtccgaggg caaagaaata gaggtaggtac cagcaccacc 3480
agcggtgagg tgcgggaact ctacaacctc aaagcccata acgttgcgga tagaacctt 3540

```

ctcaggggtca atcagagcag cgtagtttgc tgcgttcggc atcagtgtctg ccagaatcgc 3600
agagtagcta tctgggtcac agtagaacac acgggtcagca gccggaacat agttcttgg 3660
cagagccgca cgagcccttag tcagagccgc aataatctcc ttaccacagcg caacttgggc 3720
5 ggtaagtgcg gccttgttct gagtgggtctc aattacggta gcagtacctt agccctcggg 3780
ggatcagctt ggctgttttg gcggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc 3840
agaacgcaga agcgggtctga taaaacagaa tttgcctggc ggtagtagcg cgggtgggtccc 3900
acctgacccc atgccgaact cagaagtgaac acgcccgtagc gccgatggta gtgtgggggtc 3960
tccccatgcg agagtaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag 4020
actgggcctt tcgttttatc tgttgtttgt cgggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc 4080
10 cgccgggagc ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccgc aggttggcgg gcaggacgcc 4140
cgccataaac tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg 4200
cgtttctaca aactcctttt gtttattttt cttaaatacat tcaaataatgt atccgctggg 4260
ggatcagctt gatggccgcc agtgtgatgg atgggaagtt cttattattt aggttagtca 4320
ggatatttcca tttcaaaaaa aaaaaaagta aaaaagaaaa attgggttgc gctatatata 4380
15 tgaaagagta tacaataatg atgtatttgg caaatcaaat accatggtct aataatcaaa 4440
cattctgatt agttgataat tcaaattgtg agcgtccaca atttgaaaga ttctgtgtaa 4500
aagtttcatt aacacggaat tcgtgtcgag tagaccttgt tgttgtgaga attcttaatt 4560
catgagttgt agggagggat ttatgtcacc acaaacagag actaaagcaa gtgttggtt 4620
caaagctggt gttaaagagt acaaattgac ttattatact cctgagtacc aaaccaagga 4680
20 tactgatata ttggcagcat tccgagtaac tcctcaacct ggagttccac ctgaagaagc 4740
agggcccgcg gtagctgccg aatcttctac tggtagatgg acaactgtat ggaccgatgg 4800
acttaccagc cttgatcggt acaaagggcg atgctaccgc atcgagcgtg ttgttgagga 4860
aaaagatcaa tatattgctt atgtagctta ccttttagac ctttttgaag aaggttctgt 4920
taccaacatg tttacttcca ttgtaggtaa cgtatttggg ttcaaagccc tgcgcgctct 4980
25 acgtctggaa gatctgcgaa tccctcctgc ttatgttaaa actttccaag gtcgcgctca 5040
tgggatccaa gttgaaagag ataaattgaa caagtatggt cgtccctgtt tgggatgtac 5100
tattaaacct aaattggggg tatctgctaa aaactacggg agagccgttt atgaatgtct 5160
tcgcggtgga cttgatttta cttaaagatga tgagaacgtg aactcacaac catttatgcg 5220
ttggagagat cgtttcttat tttgtgccga agcactttat aaagcacagg ctgaaacagg 5280
30 tgaaatcaaa gggcattact tgaatgctac tgcaggtaca tgcgaagaaa tgatcaaaag 5340
agctgtattt gctagagaat tgggcgttcc gatcgtaatg catgactact taacgggggg 5400
attcacccga aatactagct tggctcatta ttgccgagat aatgggtctac ttcttccat 5460
ccaccgtgca atgcatgcgg ttattgatag acagaagaat catggtatcc acttccgggt 5520
attagcaaaa gcgttacgta tgtctgggtg agatcatatt cactctggta ccgtagtagg 5580
35 taaacttgaa ggtgaaagag acataacttt gggctttgtt gatttactgc gtgatgattt 5640
tggtgaacaa gatcgaagtc gcggtattta tttactcaa gattgggtct ctttaccagg 5700
tgttctaccc gtggcttcag gaggtattca cgtttggcat atgcctgctc tgaccgagat 5760
ctttggggat gattccgtac tacagttcgg tggaggaact ttaggacatc cttggatctg 5820
40 cagctagttc taga 5834

```

<210> 16

<211> 96

<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Promotor
quimérico PpsbA* con sitios de restricción (EcoRI
y NdeI) y sitio de unión a ribosomas introducidos.

<400> 16

```

gaattcacct tgggtgacac gagtatataa gtcatgttat actgttgaat aaaaagcctt 60
ccattttgat taaataaagg aggattttca tatgat 96

```

55

<210> 17

<211> 106

<212> ADN

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento de ADN sintético conteniendo un minicistrón, un sitio de unión a ribosomas y sitios de restricción adicionados al plásmido pBSPpsbA.

<400> 17

catatgtatc gattacgtaa ggaggaataa accatggacg agctctagac tgcagcatgc 60
ccgggacccct aggccctgata tcaagcttct cgagctgtcg acagct 106

<210> 18

<211> 365

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica del vector pVIEP mostrando el casete para expresión de genes y los sitios de restricción adyacentes.

<400> 18

ggtaccgggc cccccctcga ggtcgacggt atcgataagc ttgatatcga attcaccttg 60
gttgacacga gtatataagt catgtttatac tgttgaataa aaagccttcc attttgatta 120
aataaaggag gattttcata tgtatcgatt acgtaaggag gaataaacca tggacgagct 180
ctagactgca gcatgcccgg gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg 240
ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat aacccttgg ggcctctaaa cgggtcttga 300
ggggtttttt gctgaaagga ggaactatat ccggatccctg atatcaagct tctcgagctg 360
tcgac 365

<210> 19

<211> 7510

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN del vector pVTPA-f-GUS entre los bordes atpB de arroz y rbcL de tabaco.

<400> 19

gtcgagggtca tgtcctgaag ttctttgttaa cgttgtaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
gtttcataat gttcgttgcc aacgatccga ggttgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
ggatctactg caggataaat ccttttgga gctaatoctc tggaaagtac ggtagtagca 180
tccaaatgtg caaatgttgt agcaggagca gggtcggtca aatcgctccg aggtacataa 240
accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
cccatttctg tactaagagt aggttgataa ccactgcag agggcattct ccctaataag 360
gcagatacct ccgatcctgc ttgaacaaaa cgaaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
tcttgcttat taacatctcg gaaatattct gccatagtta gggcagtcaa accaactctc 480
atacgagctc ctggcgggtc attcatttgg ccatagacta gagctacctt tgattcctca 540
agattttttt cattaattac tccagattcc ttcatctcca tataaagatc atttcttcca 600
cgagtcggtt cccctactcc gccaaatacg gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
ttgattaatt ccatgatgag tactgtttta cctactccag ctcccccaa tagtccgatt 720
tttctccac gccgataagg agctaaaaga tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
gataatttctg tacttaactc gataaaggcg ggcgcggtac tatgaatagg gaatgttgca 840
ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggctcccaa gaacgttgaa aattcgctca 900
agagtagctc caccgacagc aacactgaga ggagctcccg tgtcaatcac ttccattcct 960
ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020

	tgttgtacct	cacaagttac	attaatttgc	ttaccgtcag	tgtctcgact	cttgactacc	1080
	aaagcattat	aaatataagg	taacttgccc	gggggaaaag	tgacatccag	cacgggtcca	1140
	ataatttgat	cgatacgccc	tgtacttttt	tcttcaattg	tagaaaacccc	gggacgagaa	1200
5	gtagtaggat	tggttctcat	aattatcaca	taattttcaa	aaaaaaaggaa	tttatcagaa	1260
	ttttgatttt	tttcttggtg	aataatgcca	aatcaacacc	aaaaaaatat	ccaaaaatcc	1320
	aaaagtcaaa	aggaaatgaa	ttagttaatt	caataagaga	gaaaagggga	ccagcacttg	1380
	atttcggttg	ccaaacgaat	cccatccaat	cgtttactca	tggaaatgagt	ccgtcggaaa	1440
	gttcaatcaa	tctttttttc	atatacattt	tgccttttgt	aaacgatttg	tgcctactct	1500
	actttcttat	ctaggacttc	gatatacaaa	atatatacta	ctgtgaagca	tagattgtctg	1560
10	tcaacagaga	attttctgtag	tatttaggta	tttccactca	aaataagaaa	agggggtcta	1620
	ttaagaactt	aataaggatt	agaagttgat	ttgggggttg	gctatatcta	ttaaagagta	1680
	tacaataaag	atggatttgg	tgaatcaaat	ccatgggtta	ataatcgaag	catgttaaact	1740
	tacaataaca	acaactcaag	tcgaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acagggtgta	1800
	ccccatatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
15	ccccccattt	tgtcgacggc	ctttttggcc	aagcttgata	tcggtaaagg	ggaataaacc	1920
	atggtacgtc	ctgtagaaac	cccaaccctg	gaaatcaaaa	aactcgacgg	cctgtgggca	1980
	ttcagtcctg	atcgcgaaaa	ctgtggaatt	gatcagcggt	ggtgggaaag	cgcggtacaa	2040
	gaaagccggg	caattgctgt	gccaggcagt	tttaacgatc	agttcgccga	tgcagatatt	2100
	cgtaattatg	cgggcaacgt	ctggtatcag	cgcgaaagtct	ttataccgaa	aggttgggca	2160
20	ggccacgcga	tcgtgctgcg	tttcgatgcg	gtcactcatt	acggcaaagt	gtgggtcaat	2220
	aatcaggaag	tgatggagca	tcagggcggc	tatacgccat	ttgaagccga	tgtaacgcgg	2280
	tatgttattg	ccgggaaaag	tgtacgtatc	accgtttgtg	tgaacaacga	actgaactgg	2340
	cagactatcc	cgccgggaat	ggtgattacc	gacgaaaacg	gcaagaaaaa	gcagtccttac	2400
	ttccatgatt	tctttaacta	tgcgggaatc	catcgacgag	taatgctcta	caccacgccc	2460
25	aacacctggg	tggacgatat	caccgtgggt	acgcatgtcg	cgcaagactg	taaccacgog	2520
	tctgttgact	ggcaagtggt	ggccaattgg	gatgtcagcg	ttgaactgcg	tgatgcggat	2580
	caacaggtgg	ttgcaactgg	acaaggcact	agcgggactt	tgcaagtggg	gaatccgcac	2640
	ctctggcaac	cgggtgaagg	ttatctctat	gaactgtgcg	tcacagccaa	aagccagaca	2700
	gagtgtgata	tctaccgcgt	tcgctgcggc	atccgggtcag	tggcagtgaa	gggcgaacag	2760
30	ttcctgatta	accacaaacc	gttctacttt	actggccttg	gtcgtcatga	agatgcggac	2820
	ttgcgtggca	aaggatttoga	taacgtgctg	atgggtgcacg	accacgcatt	aatggactgg	2880
	attggggcca	actcctaccg	tacctcgcat	tacccttacg	ctgaagagat	gctcgactgg	2940
	gcagatgaac	atggcatcgt	ggtgattgat	gaaactgctg	ctgtcggctt	taacctctct	3000
	ttaggcattg	gtttcgaagc	gggcaacaag	ccgaaagaac	tgtaacgcga	agaggcagtc	3060
35	aacggggaaa	ctcagcaagc	gcacttacag	gcgattaaaag	agctgatagc	gcgtgacaaa	3120
	aaccacccaa	gcgtggtgat	gtggagtatt	gccaacgaac	cggatacccg	tccgcaaggt	3180
	gcacgggaat	atttcgcgcc	actggcggaa	gcaacgcgta	aactcgaccc	gacgcgtccg	3240
	atcacctgcg	tcaatgtaat	gttctgcgac	gctcacaccg	ataccatcag	cgatctcttt	3300
	gatgtgctgt	gcctgaaccg	ttattacgga	tggtatgtcc	aaagcggcga	tttggaacag	3360
40	gcagagaagg	tactggaaaa	agaacttctg	gcctggcagg	agaaactgca	tcagccgatt	3420
	atcatcaccg	aatacggcgt	ggatacgtta	gcggggctgc	actcaatgta	caccgacatg	3480
	tgagtggaag	agtatcagtg	tgcatggctg	gatattgtatc	accgcgtctt	tgatcgctgc	3540
	agcgccgctg	tcggtgaaca	ggtatggaat	ttcgccgatt	ttgcgacctc	gcaaggcata	3600
	ttgcgcgttg	gcggtaaaca	gaaagggatc	ttcactcgcg	accgcaaaac	gaagtccggc	3660
45	gcttttctgc	tgcaaaaaac	ctggactggc	atgaacttcg	gtgaaaaaac	gcagcaggga	3720
	ggcaaacaa	gaattcgagc	tcggtacccc	gcgtataggg	cccaattcga	gctcggtaac	3780
	agcaccacca	gcggtgaggt	gcggaacttc	tacaacctca	aagcccataa	cgttgcggat	3840
	agaaccttct	tcagggtcaa	tcagagcagc	gtagtttgct	gcgttcggca	tcagtgtctg	3900
	cagaatcgca	gagtagctat	ctgggtcaca	gtagaacaca	cggtcagcag	ccggaacata	3960
50	gttcttggtc	agagccgcac	gagccttagt	cagagccgca	ataatctcct	taccagcgcg	4020
	aacttggctg	gtcaagtgcg	gccttgttct	gagtggtctc	aattacggta	gcagtaccta	4080
	agccctcggg	ggatctgggg	aggaatgaga	tatgaaaaag	cctgaactca	ccgcgacgtc	4140
	tgctcgagaag	tttctgatcg	aaaagttcga	cagcgtctcc	gacctgatgc	agctctcgga	4200
	gggcgaagaa	tctcgtgctt	tcagcttcga	tgtaggaggg	cgtggatatg	tcctgcgggt	4260
55	aaatagctgc	gccgatgggt	tctacaaaga	tcggttatgtt	tatcgggcact	ttgcatcggc	4320
	cgcgtccccc	attccggaag	tgcttgacat	tggggagttt	agcgagagcc	tgacctattg	4380
	catctcccgc	cggtcacagg	gtgtcacggt	gcgaagacctg	cctgaaaaccg	aactgcccgc	4440
	tggtctacaa	ccggtcgcgg	aggctatgga	tgcgatcgct	gcggccgatc	ttagccagac	4500
	gagcgggttc	ggcccatteg	gaccgcaagg	aatcggtcaa	tacactacat	ggcgtgattt	4560
60	catatgcgcg	attgctgatc	cccatgtgta	tcactggcaa	actgtgatgg	acgacaccgt	4620
	cagtgcgtcc	gtcgcgcagg	ctctcgatga	gctgatgctt	tgggcccagg	actgccccga	4680

```

5  agtccggcac ctcgtgcacg cggatttcgg ctccaacaat gtcctgacgg acaatggccg 4740
   cataacagcg gtcattgact ggagcgaggc gatgttcggg gattcccaat acgaggctcg 4800
   caacatcttc ttctggaggc cgtgggttgg ttgtatggag cagcagacgc gctacttcga 4860
   gcgaggacat ccggagcttg caggatcgcc acgactccgg gcgtatatgc tccgcattgg 4920
10 tcttgaccaa ctctatcaga gcttggttga cggcaatttc gatgatgcag cttgggcgca 4980
   gggtcgatgc gacgcaatcg tccgatccgg agccgggact gtcgggcgta cacaaatcgc 5040
   ccgcagaagc gcggccgtct ggaccgatgg ctgtgtagaa gtactcgccg atagtggaaa 5100
   ccgacgcccc agcactcgtc cgagggcaaa gaaatagagt aggtaccagc accaccagcg 5160
   gtgagggtgc gaacttctac aacctcaaa cccataacgt tgcggataga acccttctca 5220
15 gggtcfaatc gagcagcgta gtttgcctgc ttccggcatca gtgctgccag aatcgcacag 5280
   tagctatctg ggtcacagta gaacacacgg tcagcagccg gaacatagtt cttggtcaga 5340
   gccgcacgag ccttagtcag agccgcaata atctccttac ccagcgcaac ttggtcggta 5400
   agtgccgacct tgttctgagt ggtctcaatt acggtagcag tacctaagcc ctccggggat 5460
   cagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc tgatacagat taaatcagaa 5520
15 ccgacaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcgcca gtacgcggg ggtcccacct 5580
   gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg atggtagtgt ggggtctccc 5640
   catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg 5700
   ggcctttcgt tttatctggt gtttgcctgc gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc 5760
   gggagcggat ttgaacggtg cgaagcaacg gcccgagggg tggcgggcag gacgcccgcc 5820
20 ataaactgcc aggcattcaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc ttttgcgtt 5880
   tctacaaact ctttttggtt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctggggat 5940
   cagcttgatg gccgccagtg tgatggatgg gaagttctta ttatttaggt tagtcaggta 6000
   tttccatttc aaaaaaaaaa aaagtaaaaa agaaaaattg ggttgcgcta tatatatgaa 6060
   agagtataca ataattgatg atttggcaaa tcaaatacca tggctctaata atcaaacatt 6120
25 ctgattagtt gataattcaa attgtgagcg ctcacaattt gaaagattcc tgtgaaaagt 6180
   ttcatthaaca cgaattcgt gtcgagtga ccttggtgtt gtgagaattc ttaattcatg 6240
   agttgtaggg agggatttat gtcaccacaa acagagacta aagcaagtgt tggattcaaa 6300
   gctggtgtta aagagtacaa attgacttat tatactcctg agtaccaaac caaggatact 6360
   gatataattg cagcattccg agtaactcct caacctggag ttccacctga agaagcaggy 6420
30 gccgcggtag ctgccgaatc ttctactggt acatggacaa ctgtatggac cgatggactt 6480
   accgaccttg atcgttacaa agggcgatgc taccgcatcg agcgtgttgt tggagaaaaa 6540
   gatcaatata ttgcttatgt agcttaccct ttagaccttt ttgaagaagg ttctgttacc 6600
   aacatgttta cttccattgt aggtaacgta tttgggttca aagccctgcg cgctctacgt 6660
   ctggaagatc tgccaatccc tcctgcttat gttaaaactt tccaagggtc gcctcatggy 6720
35 atccaagttg aaagagataa attgaacaag tatggtcgtc ccctgttggg atgtactatt 6780
   aaacctaagt tggggttatc tgctaaaaac tacggtagag ccgtttatga atgtcttcgc 6840
   ggtgcacttg attttactaa agatgatgag aacgtgaact cacaaccatt tatgcgttgg 6900
   agagatcggt tcttattttg tgccgaagca ctttataaag cacaggctga aacagggtgaa 6960
   atcaaagggc attacttgaa tgctactgca ggtacatgcg aagaaatgat caaaagagct 7020
40 gtatttgcta gagaattggg cgttccgatc gtaatgcatg actacttaac ggggggattc 7080
   accgcaaata ctgcttggc tcattattgc cgagataatg gtctacttct tcacatccac 7140
   cgtgcaatgc atgcggttat tgatagacag aagaatcatg gtatccactt ccgggtatta 7200
   gcaaaagcgt tacgtatgtc tgggtggagat catattcact ctggtaccgt agtaggtaaa 7260
   cttgaagggt aaagagacat aactttgggc tttgttgatt tactgcgtga tgattttgtt 7320
45 gaacaagatc gaagtgcggg tatttatttc actcaagatt gggctctctt accagggtgtt 7380
   ctaccgctgg cttcaggagg tattcacgtt tggcatatgc ctgctctgac cgagatcttt 7440
   ggggatgatt ccgtactaca gttcggtgga ggaactttag gacatccttg gatctgcagc 7500
   tagttctaga 7510

```

50

<210> 20

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 Oligonucleótido empleado para amplificar el gen
 aadA con secuencia tipo Shine-Dalgarno
 incorporada.

60

<400> 20
aaggagaata ccatggggga agcgggtgatc gcc 33

5 <210> 21
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
Oligonucleótido empleado para amplificar el gen
aadA.

15 <400> 21
gaacgagctc ttagacatta tttgccgac 29

20 <210> 22
<211> 6659
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
nucleotídica de un fragmento de ADN del vector
pVTPA-aadA entre los bordes atpB de arroz y rbcL
de tabaco.

30 <400> 22
gtcgagggtca tgtcctgaag ttcttttgtaa cgttgtaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
gtttcataat gttcgttgcc aacgatccga gggtgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
ggatctactg caggataaat cccttttgaa gctaactctc tggaaagtac ggtagtagca 180
tccaaatgtg caaatgttgt agcaggagca gggtcgggtca aatcgtccgc aggtacataa 240
35 accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
cccatttctg tactaagagt aggttgataa cccactgcag agggcattct ccctaataag 360
gcagataacct ccgatcctgc ttgaacaaaa cgaaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
tcttgcttat taacatctcg gaaatattct gccatagtta gggcagtcaa accaactctc 480
atacagagctc ctggcgggttc attcatttgg ccatagacta gagctacctt tgattcctca 540
40 agattttttt cattaattac tccagattcc ttcatittcca tataaagatc atttccttca 600
cgagtcggtt cccctactcc gccaaatagc gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
ttgattaatt ccatgatgag tactgtttta cctactccag ctcccccaa tagtccgatt 720
tttctctcac gccgataagg agctaaaaga tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
gataatttgc tatctaactc gataaaggcg ggcgcggatc tatgaatagg gaatgttgca 840
45 ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggtccccaa gaacggtgaa aattcgtcca 900
agagtagctc caccgacagg aacactgaga ggagctcccg tgtcaatcac ttccattcct 960
ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020
tggtgtacct cacaagttac attaatttgc ttaccgtcag tgtctcgact cttgactacc 1080
aaagcattat aaatataagg taacttgccc gggggaaaag tgacatccag cacgggtcca 1140
50 ataatttgat cgatacgccc tgtacttttt tcttcaattg tagaaacccc gggacgagaa 1200
gtagtaggat tggttctcat aattatcaca taattttcaa aaaaaaggaa tttatcgaaa 1260
ttttgatttt tttctgtgtg aataatgcc aatcaacacc aaaaaaatat ccaaaaatcc 1320
aaaagtcaaa aggaaatgaa ttagtttaatt caataagaga gaaaagggga ccagcacttg 1380
atttcggttg ccaaacgaat ccatttcaat cgtttactca tggaatgagt ccgtcggaag 1440
55 gttcaatcaa tctttttttc atatacattt tgccttttgt aaacgatttg tgctactct 1500
actttcttat ctaggacttc gatatacaaa atataacta ctgtgaagca tagattgctg 1560
tcaacagaga attttcgtag tatttaggta ttccactca aaataagaaa agggggtcta 1620
ttaagaactt aataaggatt agaagttgat ttggggttgc gctatatcta ttaaagagta 1680
tacaataaag atggatttgg tgaatcaaat ccatggttta ataacgaag catgttaact 1740
60 tacaataaca acaactcaag tcgaatgaat tcctatagca tagaatgtac acagggtgta 1800
cccattatat atgaatgaaa catattatat gaatgaaaca tattcattaa cttgaagcatg 1860

ccccccattt tgtcgacggc ctttttggcc aagcttgata tcgaattccc ccgggctgct 1920
cccccgccgt cgttcaatga gaatggataa gaggctcgtg ggattgacgt gagggggcag 1980
ggatggctat atttctggga gcgaactccg ggcgaatacg aagcgcttg atacagttgt 2040
5 agggagggat ttcatcgttt aaactcgaaa ggagaatacc atgggggaag cggtgatcgc 2100
cgaagtatcg actcaactat cagaggtagt tggcgtcatc gagcgccatc tcgaaccgac 2160
gttgctggcc gtacatttgt acggctccgc agtggatggc ggcctgaagc cacacagtga 2220
tattgatattg ctggttacgg tgaccgtaag gcttgatgaa acaacgcggc gagctttgat 2280
caacgacott ttggaaactt cggcttcccc tggagagagc gagattctcc gcgctgtaga 2340
agtcaccatt gttgtgcacg acgacatcat tccgtggcgt tatccagcta agcgcgaagt 2400
10 gcaatttggga gaatggcagc gcaatgacat tcttgcaagg atcttcgagc cagccacgat 2460
cgacattgat ctggctatct tgctgacaaa agcaagagaa catagcgttg ccttggtagg 2520
tccagcggcg gaggaactct ttgatccggt tcctgaacag gatctatttg aggcgctaaa 2580
tgaaacctta acgctatgga actcgccgccc cgactgggct ggcgatgagc gaaatgtagt 2640
gcttacgttg tcccgcattt ggtacagcgc agtaaccggc aaaatcgcgc cgaaggatgt 2700
15 cgtgcccagc tgggcaatgg agcgcctgccc ggcccagtat cagcccgtca tacttgaagc 2760
tagacaggct tatcttggac aagaagaaga tcgcttggcc tcgcgcgagc atcagttgga 2820
agaatttgtc cactacgtga aaggcgagat caccaaggta gtcggcaaat aatgtctaag 2880
agctcgttct cgagtgaacg cgtatagggc ccaattcgag ctcggtacca gcaccaccag 2940
cggtaggtg cggaacttct acaacctcaa agcccataac gttgcgga gaaccttct 3000
20 cagggtcaat cagagcagcg tagtttgctg cgttcggcat cagtgcctgc agaatcgagc 3060
agtagctatc tgggtcacag tagaacacac gttcagcagc cggaacatag ttcttgggtca 3120
gagccgcagc agccttagtc agagccgcaa taatctcctt acccagcgca acttggtcgg 3180
tcaagtgcgg ccttggtctg agtggctcct attacggtag cagtacctaa gccctcgggg 3240
gatctgggga ggaatgagat atgaaaaagc ctgaactcac cgcgacgtct gtcgagaagt 3300
25 ttctgatcga aaagttcgac agcgtctccc acctgatgca gctctcgag ggcaagaat 3360
ctcgtgcttt cagcttcgat gtaggagggc gtggatatgt cctgcccgtta aatagctgcg 3420
ccgatgcttt ctacaaagat cgttatgttt atcggcactt tgcacggcc gcgctcccga 3480
ttccggaagt gcttgacatt ggggagttta gcgagagcct gacctattgc atctcccgcc 3540
gtgcacaggg tgtaacgttg caagacctgc ctgaaaccga actgcccgt gttctacaac 3600
30 cggctcgcgga ggctatggat gcgatcgctg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg 3660
gcccattcgg accgcaagga atcgggtcaat acactacatg gcgtgatttc atatgcgcga 3720
ttgctgatcc ccatgtgtat cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg 3780
tcgcgagggc tctcgatgag ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc 3840
tcgtgcacgc ggatttcggc tccaacaatg tcctgacgga caatggccgc ataacagcgg 3900
35 tcattgactg gagcgaggcg atgttcgggg attcccaata cgaggtcgcc aacatcttct 3960
tctggaggcg gtggttggct tgtatggagc agcagacgcg ctacttcgag cggaggcatc 4020
cggagcttgc aggatcgcca cgactccggg cgtatatgct ccgcattggt cttgaccaac 4080
tctatcagag cttggttgac ggcaatttcg atgatgcagc ttggggcgag ggtcgatgcg 4140
acgcaatcgt ccgatccgga gccgggactg tcgggctgac acaaatcgcc cgcaagcg 4200
40 cggccgtctg gaccgatggc tgtgtagaag tactcgccga tagtgaaaac cgacgcccc 4260
gcactcgtcc gagggcaag aaatagagta ggtaccagca ccaccagcg tgaggtgcg 4320
aaacttctaca acctcaagc tcgatagaa cccttctcag ggtcaatcag 4380
agcagcgtag tttgctgcgt tcggcatcag tgctgccaga atcgagagt agctatctgg 4440
gtcacagtag aacacacggt cagcagccgg aacatagttc ttggtcagag ccgcacgagc 4500
45 cttagtcaga gccgcaataa tctccttacc cagcgcaact tggtcggtaa gtgcccctt 4560
gttctgagtg gtctcaatta cggtagcagt acctaaagccc tcgggggatc agcttggtg 4620
ttttggcgga tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg 4680
tctgataaaa cagaatttgc ctggcgcgag tagcgcggtg gtcccaacct acccatgcc 4740
gaactcagaa gtgaaacgcc gtagcgccga tggtagtgtg gggctctccc atgcgagagt 4800
50 agggaaactgc caggcatcaa ataaaaacgaa aggcctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt 4860
ttatctgttg tttgtcgggt aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccc ggagcgatt 4920
tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggt ggcgggcagg acgcccggca taaactgcca 4980
ggcatcaaat taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcggtt ctacaaactc 5040
tttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctgggggatc agcttgatgg 5100
55 cggccagtgt gatggatggg aagttcttat tatttaggtt agtcagggtat ttccatttca 5160
aaaaaaaaaa aagtaaaaaa gaaaaattgg gttgcgctat atatatgaaa gagtatacaa 5220
taatgatgta tttggcaaat caaataccat ggtctaatata tcaaacattc tgattagttg 5280
ataattcaaa ttgtgagcgc tcacaatttg aaagattcct gtgaaaagtt tcattaacac 5340
ggaattcgtg tcgagtagac cttgttgttg tgagaattct taattcatga gttgtaggga 5400
60 gggatttatg tcaccacaaa cagagactaa agcaagtgtt ggattcaaaag ctgggtgtta 5460
agagtacaaa ttgacttatt atactcctga gtaccaaacc aaggatactg atatattggc 5520

```

5  agcattccga gtaactcctc aacctggagt tccacctgaa gaagcagggg ccgcggtagc 5580
   tgccgaatct tctactggta catggacaac tgtatggacc gatggactta ccagccttga 5640
   tcggttacaaa gggcgatgct accgcatcga gcgtgttggt ggagaaaaag atcaatatat 5700
   tgcttatgta gcttaccctt tagacctttt tgaagaaggt tctgttacca acatgtttac 5760
   ttccattgta ggtaacgtat ttgggttcaa agccctgcgc gctctacgtc tggaagatct 5820
   gcgaatccct cctgcttatg ttaaaacttt ccaaggtccg cctcatggga tccaagttga 5880
   aagagataaa ttgaacaagt atggtcgtcc cctgttgga tgtactatta aacctaaatt 5940
   ggggttatct gctaaaaact acggtagagc cgtttatgaa tgtcttcgcg gtggacttga 6000
   ttttactaaa gatgatgaga acgtgaactc acaaccattt atgcgttgga gagatcgttt 6060
10  cttattttgt gccgaagcac tttataaagc acaggctgaa acaggtgaaa tcaaagggca 6120
   ttacttgaat gctactgcag gtacatgcga agaaatgatc aaaagagctg tatttgctag 6180
   agaattgggc gttccgatcg taatgcatga ctacttaacg gggggattca ccgcaaatac 6240
   tagcttggtc cattattgcc gagataatgg tctacttctt cacatccacc gtgcaatgca 6300
   tcggtttatt gatagacaga agaatcatgg tatccacttc cgggtattag caaaagcgtt 6360
15  acgtatgtct ggtggagatc atattcactc tggtaaccgt gtaggtaaac ttgaaggtga 6420
   aagagacata actttgggct ttgttgattt actgcgtgat gattttgttg aacaagatcg 6480
   aagtgcgggt atttatttca ctcaagattg ggtctcttta ccaggtgttc taccggtggc 6540
   ttcaggaggt attcacgttt ggcataatgcc tgctctgacc gagatctttg gggatgattc 6600
   cgtactacag ttcggtggag gaacttttag acatccttgg atctgcagct agttctaga 6659
20

```

<210> 23

<211> 8327

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
nucleotídica de un fragmento de ADN del vector
pVTPA-f-GUS-aadA entre los bordes atpB de arroz y
rbcl de tabaco.

<400> 23

```

35  gtcgaggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cgttgtaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
   gtttcataat gttcgttgcc aacgatccga ggttgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
   ggactacttg caggataaat ccctttggaa gctaatacctc tggaaggtac ggtagtagca 180
   tccaaatgtg caaatgttgt agcaggagca gggctcgggtc aatcgtccgc aggtacataa 240
   accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
   ccattttctg tactaagagt aggttgataa cccactgcag agggcattct ccctaataag 360
40  gcagatacct ccgatccctg ttgaacaaaa cgaaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
   tcttgcttat taacatctcg gaaatattct gccatagtta gggcagtcac accaactctc 480
   atacgagctc ctggcgggtc attcatTTgg ccatagacta gagctacott tgattcctca 540
   agattttttt cathtaattac tccagattcc ttcatTTcca tataaagatc atttccttca 600
   cgagtcctgt cccctactcc gccaaatacg gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
45  ttgattaatt ccatgatgag tactgtttta cctactccag ctcccccaa tagtccgatt 720
   tttcctccac gccgataagg agctaaaaga tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
   gataatttgc tatctaactc gataaaggcg ggcgcggatc tatgaatagg gaatgttgca 840
   ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggctcccca gaacgttgaa aattcgtcca 900
   agagtagctc caccgacagg aacactgaga ggagctcccc tgtcaatcac ttccattcct 960
50  ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020
   tgttgtagct cacaagttac attaatTTgc ttaccgtcag tgtctcgact cttgactacc 1080
   aaagcattat aaatataagg taacttgccc ggggggaaaag tgacatccag cacgggtcca 1140
   ataatttgat cgatacgccc tgtacttttt tcttcaattg tagaaacccc gggacgagaa 1200
   gtagtaggat tggttctcat aattatcaca taattttcaa aaaaaaggaa tttatcgaaa 1260
55  ttttgatttt tttcttggtg aataatgcca aatcaacacc aaaaaatat ccaaaaatcc 1320
   aaaagtcaaa aggaaatgaa ttagttaatt caataagaga gaaaagggga ccagcacttg 1380
   atttcgattg ccaaacgaat cccattcaat cgtttactca tggaatgagt ccgtcgga 1440
   gttcaatcaa tctttttttc atatacattt tgctctttgt aaacgatttg tgcctactct 1500
   actttcttat ctaggacttc gatatacaaa atatatacta ctgtgaagca tagattgctg 1560
60  tcaacagaga attttcgtag tatttaggta tttccactca aaataagaaa aggggggtcta 1620
   ttaagaactt aataaggatt agaagttgat ttgggggttc gctatatcta ttaaagagta 1680

```

	tacaataaag	atggatttgg	tgaatcaaat	ccatgggttta	ataatcgaag	catgttaact	1740
	tacaataaca	acaactcaag	tcgaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acaggggtgta	1800
	cccattatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
	ccccccattt	tgctcgacggc	cttttttggcc	aagcttgata	tcggtaagga	ggaataaacc	1920
5	atggtacgtc	ctgtagaaac	cccaaccctg	gaaatcaaaa	aactcgacgg	cctgtgggca	1980
	ttcagtcctg	atcgcgaaaa	ctgtggaatt	gatcagcgtt	gggtgggaaag	cggtttacaa	2040
	gaaagccggg	caattgctgt	gccaggcagt	tttaacgatc	agttcgccga	tgcagatatt	2100
	cgtaattatg	cgggcaacgt	ctggtatcag	cgcgaaagtct	ttataaccgaa	aggttgggca	2160
	ggccagcgta	tcgtgctgcg	tttcgatgcg	gtcactcatt	acggcaaaagt	gtgggtcaat	2220
10	aatcaggaag	tgatggagca	tcagggcgcg	tatacgccat	ttgaagccga	tgtcacgcgg	2280
	tatgtttattg	ccgggaaaaag	tgtacgtatc	accgtttgtg	tgaacaacga	actgaactgg	2340
	cagactatcc	cgccgggaat	ggtgattacc	gacgaaaaacg	gcaagaaaaa	gcagtcttac	2400
	ttccatgatt	tcttttaacta	tgccggaatc	catcgcagcg	taatgctcta	caccacgcgg	2460
	aacacctggg	tggacgatat	caccgtgggtg	acgcattgtcg	cgcaagactg	taaccaacgcg	2520
15	tctgttgact	ggcaggtggg	ggccaatggg	gatgtcagcg	ttgaactgcg	tgatgcggat	2580
	caacaggtgg	ttgcaactgg	acaaggcact	agcgggactt	tgcaagtggg	gaatccgcac	2640
	ctctggcaac	cggttgaaag	ttatctctat	gaactgtgcg	tcacagccaa	aagccagaca	2700
	gagtgtgata	tctaccgcgt	tcgcgtcggc	atccgggtcag	tggcagtgaa	gggcaaacag	2760
	ttcctgatta	accacaaacc	gttctactttt	actggctttg	gtcgtcatga	agatgcggag	2820
20	ttgcgtggca	aaggatttoga	taacgtgctg	atgggtgcacg	accacgcatt	aatggactgg	2880
	attggggcca	actcctacgg	tacctcgcat	tacccttacg	ctgaagagat	gctcgactgg	2940
	gcagatgaac	atggcatcgt	ggtgattgat	gaaactgctg	ctgtcggctt	taacctctct	3000
	ttaggcattg	gtttcgaagc	gggcaacaag	ccgaaagaac	tgtacagcga	agaggcagtc	3060
	aacggggaaa	ctcagcaagc	gcacttacag	gcgattaaag	agctgatagc	gcgtgacaaa	3120
25	aaccacccaa	gcgtgggtgat	gtggagtatt	gccaacgaac	cggatacccg	tccgcaagggt	3180
	gcacgggaat	atctcgcgcc	actggcgga	gcaacgcgta	aactcgaccc	gacgcgtccg	3240
	atcacctgcg	tcaatgtaat	gttctgcgac	gctcacaccg	ataccatcag	cgatctcttt	3300
	gatgtgctgt	gcttgaaccg	ttattacgga	tggtatgtcc	aaagcggcga	tttggaaaacg	3360
	gcagagaagg	tactggaaaa	agaacttctg	gcctggcagg	agaaaactgca	tcagccgatt	3420
30	atcatcaccg	aatacggcgt	ggatacgtta	gcccggctgc	actcaatgta	caccgacatg	3480
	tgagctgaag	agtatcagtg	tgcatggctg	gatgtgtatc	accgcgtctt	tgatcgcgtc	3540
	agcgccgtcg	tcgggtgaaca	ggtatggaat	ttcgccgatt	ttgcgacctc	gcaaggcata	3600
	ttgcgcgttg	gcggtaacaa	gaaagggatc	ttcactcgcg	accgcaaac	gaagtcggcg	3660
	gcttttctgc	tgcaaaaaacg	ctggactggc	atgaacttcg	gtgaaaaacc	gcagcaggga	3720
35	ggcaaaaca	gaattcgagc	tcgggtacccc	gcgtatagaa	ggagaataacc	atgggggaag	3780
	cgggtgatcgc	cgaagtatcg	actcaactat	cagaggtagt	tggcgtcatc	gagcgccatc	3840
	tcgaaccgac	gttgctggcc	gtacatttgt	acggctccgc	agtggatggc	ggcctgaagc	3900
	cacacagtg	tattgatttg	ctgggtacgg	tgaccgtaag	gcttgatgaa	acaacgcggc	3960
	gagctttgat	caacgacctt	ttggaaaactt	cggtctcccc	tggagagagc	gagattctcc	4020
40	gcgctgtaga	agtcaccatt	gttggtgcag	acgacatcat	tccgtggcgt	tatccagcta	4080
	agcgcgaact	gcaatttgga	gaatggcagc	gcaatgacat	tcttgacagg	atcttcgagc	4140
	cagccacgat	cgacattgat	ctggctatct	tgctgacaaa	agcaagagaa	catagcgttg	4200
	ccttggttagg	tccagcggcg	gaggaactct	ttgatccggg	tcctgaacag	gatctatttg	4260
	aggcgctaaa	tgaaccctta	acgctatgga	actcgccggc	cgactgggct	ggcgatgagc	4320
45	gaaatgtagt	gcttacgttg	tcccgcattt	ggtaacagcg	agtaaccggc	aaaatcgcg	4380
	cgaaggatgt	cgctgccgac	tgggcaatgg	agcgcctgcc	ggcccagtat	cagcccgta	4440
	tacttgaaag	tagacaggct	tatcttgga	aagaagaaga	tcgcttgggc	tcgcgcgcag	4500
	atcagttgga	agaatttgtc	cactacgtga	aaggcgagat	caccaaggta	gtcggcaaat	4560
	aatgtctaag	agctcgttcc	aattcgagct	cggtaaccagc	accaccagcg	gtgaggtgcg	4620
50	gaacttctac	aacctcaaa	cccataacgt	tgccgtaga	acccttctca	gggtcaatca	4680
	gagcagcgta	gtttgctgcg	ttcggcatca	gtgctgccag	aatcgacagag	tagctatctg	4740
	ggtcacagta	gaacacacgg	tcagcagccg	gaacatagtt	cttggtcaga	gccgcacgag	4800
	ccttagtcag	agccgcaata	atctccttac	ccagcgcaac	ttggtcggtc	aagtgcggcc	4860
	ttgttctgag	tggctcctaat	tacggtagca	gtacctaagc	cctcggggga	tctggggagg	4920
55	aatgagatat	gaaaaagcct	gaactcaccg	cgcgtctgt	cgagaagttt	ctgatcgaaa	4980
	agttcgacag	cgtctccgac	ctgatgcagc	tctcggagg	cgaagaatct	cgtgctttca	5040
	gcttcgagtg	aggaggcggt	ggatatgtcc	tgccggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	5100
	acaaagatcg	ttatgtttat	cggcactttg	catcggccgc	gctcccagatt	ccggaagtgc	5160
	ttgacattgg	ggagtttagc	gagagcctga	cctattgcat	ctcccgcggt	gcacaggggtg	5220
60	tcacgttgca	agacctgctt	gaaaccgaac	tgcccgtgt	tctacaaccg	gtcgcggagg	5280
	ctatggatgc	gatcgctgcg	gccgatctta	gccagacgag	cgggttcggc	ccattcggac	5340

```

cgcaaggaat cgggtcaatac actacatggc gtgattttcat atgctgcgatt gctgatcccc 5400
atgtgtatca ctggcaaact gtgatggacg acaccgtcag tgcgtccgtc ggcgaggctc 5460
tcgatgagct gatgcttttg gccgaggact gccccgaagt cccggcacctc gtgcacgcgg 5520
atctcggtc caacaatgtc ctgacggaca atggccgcat aacagcggtc attgactgga 5580
5 gcgaggcgat gttcggggat tcccaatacg aggtcgccaa catcttcttc tggaggccgt 5640
ggttggttg tatggagcag cagacgcgct acttcgagcg gaggcattccg gagcttgcag 5700
gatcgccacg actccgggcg tatatgtctc gcatttggtct tgaccaactc tatcagagct 5760
tggttgacgg caatttcgat gatgcagctt gggcgagggg tcgatgacgac gcaatcgtcc 5820
gatccggagc cgggactgtc gggcggtacac aaatcgcccg cagaagcgcg gccgtctgga 5880
10 ccgatggctg tgtagaagta ctgcgcgata gtggaaacccg acgccccagc actcgtccga 5940
gggcaaagaa atagagtagg taccagcacc accagcgggtg aggtgcggaa cttctacaac 6000
ctcaaagccc ataacgttgc ggatagaacc cttctcaggg tcaatcagag cagcgtagtt 6060
tgctcggttc ggcattcagtg ctgcagaaat cgcagagtag ctatctgggt cacagtagaa 6120
cacacgggtc gcagccggaa catagttctt ggtcagagcc gcacgagcct tagtcagagc 6180
15 cgcaataatc tccttaccga cgcgaacttg gtcggttaagt gggccttgt tctgagtggt 6240
ctcaattacg gtagcagtag ctaagccctc gggggatcag cttggctgtt ttggcggtg 6300
agagaagatt ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca 6360
gaatttgctt ggcggcagta gcgcggtggt cccacctgac cccatgccga actcagaagt 6420
gaaacgcccgt agcgcgcatg gtagtgtggg gtctccccat gcgagagtag ggaactgcca 6480
20 ggcattcaaat aaaacgaaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgg 6540
tgtcggtgaa cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg agcggatttg aacgttgcca 6600
agcaacggcc cggagggttg cgggcaggac gcccgccata aactgccagg catcaaat 6660
agcagaaggc catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct acaaaactct tttgtttatt 6720
tttctaataa cattcaaata tgtatccgct gggggatcag cttgatggcc gccagtgtga 6780
25 tggatgggaa gttcttatta tttaggttag tcaggtattt ccatttcaaa aaaaaaaaaa 6840
gtaaaaaaga aaaattgggt tgcgtatat atatgaaaga gtatacaata atgatgtatt 6900
tggcaaatca aataccatgg tctaataatc aaacattctg attagttgat aattcaaat 6960
gtgagcgctc acaatttgaa agattcctgt gaaaagtttc attaacacgg aattcgtgtc 7020
gagtagacct tgttgttgtg agaattctta attcatgagt ttagggagg gatttatgtc 7080
30 accacaaaca gagactaaag caagtgttgg attcaagct ggtgttaaag agtacaatt 7140
gactttattt actcctgagt accaaaccaa ggatactgat atattggcag cattccgagt 7200
aactcctcaa cctggagttc cacctgaaga agcagggggc gcggtagctg ccgaatcttc 7260
tactggtaca tggacaactg tatggaccga tggacttacc agccttgatc gtacaaagg 7320
gcgatgctac cgcattcgagc gtgtgttgg agaaaaagat caatatattg cttatgtagc 7380
35 ttacccttta gacctttttg aagaagggtc tgttaccac atgtttactt ccattgtagg 7440
taacgtattt gggttcaaag cctgcgcgc tctacgtctg gaagatctgc gaatccctcc 7500
tgcttatgtt aaaactttcc aaggtccgcc tcatgggatc caagttgaaa gagataaatt 7560
gaacaagtat ggtcgtcccc tgttgggatg tactattaaa cctaaattgg ggttatctgc 7620
taaaaactac ggtagagccg tttatgaatg tcttcgcggt ggacttgatt ttactaaaga 7680
40 tgatgagaac gtgaactcac aaccttttat gcgttgaga gatcgtttct tattttgtgc 7740
cgaagcactt tataaagcac aggtgaaatc aaagggcatt acttgaatgc 7800
tactcgaggt acatgcgaag aatatgataa aagagctgta tttgctagag aattgggcgt 7860
tccgatcgta atgcatgact acttaacggg gggattcacc gcaaatacta gcttggtcca 7920
ttattgccga gataatggtc tacttcttca catccaccgt gcaatgcatt cggttattga 7980
45 tagacagaag aatcatggta tccacttccg ggtattagca aaagcgttac gtatgtctgg 8040
tggagatcat attcactctg gtaccgtagt aggtaaactt gaaggtgaaa gagacataac 8100
tttgggcttt gttgatttac tgcgtgatga ttttgttgaa caagatcgaa gtcgcggtat 8160
ttatttctact caagattggg tctctttacc aggtgttcta cccgtggctt caggaggtat 8220
tcacgttttg catatgcctg ctctgaccga gatctttggg gatgattccg tactacagtt 8280
50 cgggtggagga acttttaggac atccttggat ctgcagctag ttctaga 8327

```

<210> 24

<211> 7549

55 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
nucleotídica de un fragmento de ADN del vector
pVTPA-HB-aadA entre los bordes atpB de arroz y

rbcL de tabaco.

<400> 24

5	gtcgaagggtca	tgctcctgaag	ttctttgttaa	cgttgttaaag	tttgcttaaac	tctttgtgca	60
	gtttcataat	gttcgttgcc	aacgatccga	ggttgttaaca	tagttgaggt	tgaatctaaa	120
	ggatctactg	caggataaat	ccctttggaa	gctaatcctc	tggaaagtac	ggtagtagca	180
	tccaaatgtg	caaatgttgt	agcaggagca	gggtcgggtca	aatcgtccgc	aggtagcataa	240
	accgcttgga	tcgaagttat	agatcccttt	ttagtagaag	taattctttc	ttgcaaaaga	300
	cccattttctg	tactaagagt	aggttgataa	cccactgcag	agggcattct	ccctaataag	360
10	gcagatacct	ccgatccctgc	ttgaacaaaa	cgaaagatat	tatcgatgaa	tagaagcacg	420
	tcttgcttat	taacatctcg	gaaatattct	gccatagtta	gggcagtcac	accaactctc	480
	atagcagctc	ctggcggttc	attcattttg	ccatagacta	gagctacctt	tgattcctca	540
	agattttttt	cattaattac	tccagattcc	ttcattttcca	tataaagatc	atttccttca	600
	cgagtcggtt	cccttactcc	gccaataacg	gatacgcgcc	cgtgagcttt	agcaatattg	660
15	ttgatttaatt	ccatgatgag	tactgtttta	cctactccag	ctcccccaaa	tagtccgatt	720
	tttcctccac	gccgataagg	agctaaaaga	tcgaccacct	taataccagt	ttcaaagatg	780
	gataatttcg	tatctaactc	gataaaggcg	ggcgcggtac	tatgaatagg	gaatggtgca	840
	ctagtatcta	caggacccaa	attgtcaaca	ggctcccca	gaacgttgaa	aattcgtcca	900
	agagtagctc	caccgacagg	aacactgaga	ggagctcccg	tgtcaatcac	ttccattcct	960
20	ctcatcaacc	actctgtagc	actcatagct	acagctctaa	ctcgattatt	tcctaataat	1020
	tggtgtacct	cacaagttac	attaattttg	ttaccgtcag	tgtctcgact	cttgactacc	1080
	aaagcattat	aaatataagg	taacttgccc	gggggaaaag	tgacatccag	cacgggtcca	1140
	ataatttgat	cgatacgccc	tgtacttttt	tcttcaattg	tagaaacccc	gggacgagaa	1200
	gtagtaggat	tggtttctcat	aattatcaca	taattttcaa	aaaaaaggaa	tttatcgaaa	1260
25	ttttgatttt	tttcttggtg	aataatgcca	aatcaacacc	aaaaaaatat	ccaaaaatcc	1320
	aaaagtcaaa	aggaaatgaa	ttagttaatt	caataagaga	gaaaagggga	ccagcacttg	1380
	atttcgttgc	ccaaacgaat	cccattcaat	cgtttactca	tggaaatgag	ccgtcggaaa	1440
	gttcaatcaa	tctttttttc	ataacattt	tgccttttgt	aaacgatttg	tgcctactct	1500
	actttcttat	ctaggacttc	gatatacaaa	atatatacta	ctgtgaagca	tagattgctg	1560
30	tcaacagaga	attttcgtag	tatttaggta	tttccactca	aaataagaaa	aggggggtcta	1620
	ttagaacatt	aataaggatt	agaagttgat	ttgggggttg	gctatatcta	ttaaagagta	1680
	tacaataaag	atggattttg	tgaatcaaat	ccatggttta	ataatcgaag	catgttaact	1740
	tacaataaca	acaactcaag	tcgaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acagggtgta	1800
	cccattatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
35	ccccccattt	tgtcgaggtc	gacggtatcg	ataagcttga	tatcggttaag	gaggaataaa	1920
	ccatggagaa	gcatacatca	gatttcctag	gaccctgct	cgtgttacag	gcgggggttt	1980
	tcttggtgac	agaatcctc	acaataccgc	agagtctaga	ctcgtggttg	acttctctca	2040
	attttctagg	gggatctccc	gtgtgtcttg	gccaaaattc	gcagtcacca	acctccaatc	2100
	actcaccaac	ctcctgtcct	ccaattttgt	ctggttatcg	ctggatgtgt	ctgcccgttt	2160
40	ttatcatatt	cctcttcate	ctgctgctat	gcctcatctt	cttattgggt	cttctggatt	2220
	atcaagggtat	gttgcccggt	tgtcctctaa	ttccaggatc	aacaacaacc	agtaggggac	2280
	catgcaaaac	ctgcacgact	cctgctcaag	gcaactctat	gtttccctca	tggtgctgta	2340
	caaaacctac	ggatggaaat	tgcacctgta	ttcccatccc	atcgctcctg	gctttcgcaa	2400
	aatacctatg	ggagtgggcc	tcagtcctgt	tctcttggct	cagtttacta	gtgccatttg	2460
45	ttcagtggtt	cgtagggtct	tccccactg	tttggctttc	agctatatgg	atgatgtggt	2520
	attggggggc	aagtctgtac	agcatcgtga	gtccctttat	accgctgtta	ccaattttct	2580
	tttgctctctg	ggtatacatt	taagaattgg	gatccggctg	ctaacaaagc	ccgaaaggaa	2640
	gctgagttgg	ctgctgccac	cgctgagcaa	taactagcat	aacccttggt	ggcctctaaa	2700
	cgggtcctga	ggggtttttt	gctgaaagga	ggaactatat	ccggatcctg	atatcaagct	2760
50	tctcgacggc	cttttttgcc	aagcttgata	tcgaattccc	ccgggctgct	ccccgcgct	2820
	cgttcaatga	gaatggataa	gaggctcgtg	ggattgacgt	gagggggcag	ggatggctat	2880
	atctctggga	gcgaactccg	ggcgaatacg	aagcgttggt	atacagttgt	agggagggat	2940
	ttcatcgttt	aaactcgaaa	ggagaatacc	atgggggaag	cggtgatcgc	cgaagtatcg	3000
	actcaactat	cagaggtagt	tggcgtcatc	gagcgccatc	tcgaaccgac	gttgctggcc	3060
55	gtacatttgg	acggctccgc	agtggatggc	ggcctgaagc	cacacagtga	tattgatttg	3120
	ctggttacgg	tgaccgtaag	gcttgatgaa	acaacgcggc	gagctttgat	caacgacctt	3180
	ttggaaactt	cggcttcccc	tggagagagc	gagattctcc	gcgctgtaga	agtcaccatt	3240
	gttggtgacg	acgacatcat	tccgtggcgt	tatccagcta	agcgcgaact	gcaatttgga	3300
	gaatggcagc	gcaatgacat	tcttcagagt	atcttcgagc	cagccacgat	cgacattgat	3360
60	ctggctatct	tgctgacaaa	agcaagagaa	catagcgttg	ccttggttagg	tccagcggcg	3420
	gaggaaactct	ttgatccggc	tcctgaacag	gatctatttg	aggcgctaaa	tgaaacctta	3480

	acgctatgga	actcgccgcc	cgactgggct	ggcgatgagc	gaaatgtagt	gcttacgttg	3540
	tcccgcattt	ggtacagcgc	agtaaccggc	aaaatcgcg	cgaaggatgt	cgctgccgac	3600
	tgggcaatgg	agcgccctgc	ggcccagtat	cagcccgta	tacttgaagc	tagacaggct	3660
	tatcttggac	aagaagaaga	tcgcttggcc	tcgcgcgcag	atcagttgga	agaatttgtc	3720
5	cactacgtga	aaggcgagat	caccaaggta	gtcggcaaat	aatgtctaag	agctcgttct	3780
	cgagtgaacg	cgtatagggc	ccaattcgag	ctcggtagca	gcaccaccag	cggtgagggtg	3840
	cggaacttct	acaacctcaa	agcccataac	gttgcggata	gaacccttct	cagggtcaat	3900
	cagagcagcg	tagtttgctg	cgttcggcac	cagtgtgtcc	agaatcgag	agtagctatc	3960
	tgggtcacag	tagaacacac	ggtcagcagc	cggaacatag	ttcttgggtca	gagccgcacg	4020
10	agccttagtc	agagccgcaa	taatctcctt	accagcgca	acttgggtcg	tcaagtgcgg	4080
	ccttgttctg	agtgggtctca	attacggtag	cagtacctaa	gccctcgggg	gatctgggga	4140
	ggaatgagat	atgaaaaagc	ctgaaactcac	cgcgacgtct	gtcgagaagt	ttctgatcga	4200
	aaagtctgac	agcgtctccg	acctgatgca	gctctcgag	ggcgaagaat	ctcgtgcttt	4260
	cagcttcgat	gtaggagggc	gtggatatgt	ctgcgggta	aatagctgcg	ccgatggttt	4320
15	ctacaagat	cgttatgttt	atcggcactt	tgcacggcc	gcgctccga	ttccggaagt	4380
	gcttgacatt	ggggagttta	gcgagagcct	gacctattgc	atctcccgcc	gtgcacaggg	4440
	tgtcacgttg	caagacctgc	ctgaaaccga	actgcccgct	gttctacaac	cggtcgcgga	4500
	ggctatggat	gcgatcgctg	cggccgatct	tagccagacg	agcgggttcg	gcccattcgg	4560
	accgcaagga	atcgggtcaat	acactacatg	gcgtgatttc	atatgcgcga	ttgtgatccg	4620
20	ccatgtgtat	cactggcaaa	ctgtgatgga	cgacaccgtc	agtgcgtccg	tcgcgcagac	4680
	tctcgatgag	ctgatgcttt	gggccgagga	ctgccccgaa	gtccggcacc	tcgtgcacgc	4740
	ggatttcggc	tccaacaatg	tcctgacgga	caatggccgc	ataacagcgg	tcattgactg	4800
	gagcagggcg	atgttcgggg	attcccaata	cgaggtcgcc	aacatcttct	tctggaggcc	4860
	gtggttggtc	tgtatggagc	agcagacgcg	ctacttcgag	cggaggcatc	cggagcttgc	4920
25	aggatggcca	cgactccggg	cgtatatgct	cgcattggt	cttgaccaac	tctatcagag	4980
	cttgggtgac	ggcaatttcg	atgatgcagc	ttgggcgag	ggtcgatgag	acgcaatcgt	5040
	ccgatccgga	gccgggactg	tcggggtgtc	acaaatcgcc	cgcagaagcg	cgcccgctcg	5100
	gaccgatggc	tgtgtagaag	tactcgccga	tagtggaaac	cgaacgcccc	gcactcgctc	5160
	gagggcaaa	aaatagagta	ggtaccagca	ccaccagcgg	tgaggtgagg	aacttctaca	5220
30	acctcaaa	ccataacgtt	gcggatagaa	cccttctcag	ggtcaatcag	agcagcgtag	5280
	tttctgtcgt	tcggcatcag	tgctgccaga	atcgagagt	agctatctgg	gtcacagtag	5340
	aacacacggt	cagcagccgg	aacatagttc	ttggtcagag	ccgcacgagc	cttagtcaga	5400
	gccgcaataa	tctccttacc	cagcgcaact	tggtcggtaa	gtgcggccct	gttctgagtg	5460
	gtctcaatta	cggtagcagt	acctaaagccc	tcgggggatc	agcttgggtg	ttttggcgga	5520
35	tgagagaaga	ttttcagcct	gatacagatt	aaatcagaac	gcagaagcgg	tctgataaaa	5580
	cagaatttgc	ctggcgccag	tagcgcggtg	gtccccactg	acccatgcc	gaactcagaa	5640
	gtgaaacgcc	gtagcgccga	tggtagtgtg	gggtctcccc	atgcgagagt	agggaaactgc	5700
	caggcatcaa	ataaaacgaa	aggctcagtc	gaaagactgg	gcctttcgtt	ttatctgttg	5760
	tttgtcgtg	aacgctctcc	tgagttaggac	aaatccgccc	ggagcggatt	tgaacgttgc	5820
40	gaagcaacgg	cccggagggt	ggcgggcagg	acgcccgcga	taaactgcga	ggcatcaaat	5880
	taagcagaag	gccatcctga	cggatggcct	ttttgcgttt	ctacaaaactc	ttttgtttaa	5940
	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctgggggatc	agcttgatgg	ccgccagtgt	6000
	gatggatggg	aagttcttat	tatttaggtt	agtcagggtat	ttccatttca	aaaaaaaaaa	6060
	aagtaaaaaa	gaaaaatttg	gttgcgctat	atatatgaaa	gagtatacaa	taatgatgta	6120
45	tttggcaaat	caaataccat	ggtctaataa	tcaaacattc	tgattagtgt	ataattcaaa	6180
	ttgtgagcgc	tcacaatttg	aaagattcct	gtgaaaagt	tcattaacac	ggaattcgtg	6240
	tcgagtagac	cttgttgttg	tgagaattct	taattcatga	gttgtaggga	gggatttatg	6300
	tcaccacaaa	cagagactaa	agcaagtgtt	ggattcaaa	ctggtgttaa	agagtacaaa	6360
	ttgacttatt	atactcctga	gtaccaaacc	aaggatactg	atatatttgc	agcattccga	6420
50	gtaactctc	aacctggagt	tccacctgaa	gaagcagggg	ccgcggtagc	tgccgaatct	6480
	tctactggta	catggacaac	tgtatggacc	gatggactta	ccagccttga	tcgttacaaa	6540
	ggcgatgct	accgcacoga	gcgtgtgtt	ggagaaaaag	atcaatata	tgcttatgta	6600
	gcttaccctt	tagacctttt	tgaagaaggt	tctgttacca	acatgtttac	ttccattgta	6660
	ggtaacgtat	ttgggttcaa	agccctgcgc	gctctacgtc	tggaagatct	gcgaatccct	6720
55	cctgcttatg	ttaaaacttt	ccaaggtccg	cctcatggga	tccaagtgtg	aagagataaa	6780
	ttgaacaagt	atgggtcgcc	cctgttggga	tgtactatta	aacctaaatt	ggggttatct	6840
	gctaaaaact	acggtagagc	cgtttatgaa	tgtcttcgcg	gtggacttga	ttttactaaa	6900
	gatgatgaga	acgtgaactc	acaaccattt	atgcgttgga	gagatcgttt	cttattttgt	6960
	gccgaagcac	tttataaagc	acaggctgaa	acagggtgaa	tcaaagggca	ttacttgaat	7020
60	gctactgcag	gtacatgcga	agaaatgatc	aaaagagctg	tatttgctag	agaattgggc	7080
	gttccgatcg	taatgcatga	ctacttaacg	gggggattca	ccgcaaatat	tagcttggct	7140

cattattgcc gagataatgg tctacttctt cacatccacc gtgcaatgca tgcgggttatt 7200
 gatagacaga agaatcatgg tatccacttc cgggtattag caaaagcgtt acgtatgtct 7260
 ggtggagatc atattcactc tggtagcgta gtaggtaaac ttgaagggtga aagagacata 7320
 actttggggt ttgttgattt actgctgtat gattttgttg aacaagatcg aagtcgcggt 7380
 5 atttatttca ctcaagattg ggtctcttta ccaggtgttc taccggtggc ttcaggaggt 7440
 attcacgttt ggcataatgcc tgctctgacc gagatctttg gggatgattc cgtactacag 7500
 ttcggtggag gaacttttag acatccttgg atctgcagct agttctaga 7549

10 <210> 25
 <211> 6465
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
 nucleotídica de un fragmento de ADN del vector
 pVTEA-Bar entre los bordes atpB de arroz y rbcL de
 tabaco.

20 <400> 25
 gtcgagggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cgttgtaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
 gtttcataat gttcgttgcc aacgatccga ggttgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
 ggatctactg caggataaaat ccctttggaa gctaactctc tggaaagtac ggtagtagca 180
 25 tccaaatgtg caaatgttgt agcaggagca gggtcggtca aatcgtcgc aggtacataa 240
 accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
 cccatttctg tactaagagt aggttgataa cccactgcag agggcattct ccctaataag 360
 gcagatacct ccgatcctgc ttgaacaaaa cgaaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
 tcttgcttat taacatctcg gaaatattct gccatagtta gggcagtcaa accaactctc 480
 30 atacgagctc ctggcggttc attcatttgg ccatagacta gagctacctt tgattcctca 540
 agattttttt cattaattac tccagattcc ttcatttcca tataaagatc atttccttca 600
 cgagtcggtt cccctactcc gccaaatacg gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
 ttgattaatt ccatgatgag tactgtttta cctactccag ccccccaaa tagtccgatt 720
 tttcctccac gccgataagg agctaaaaga tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
 35 gataatttctg tatctaactc gataaaggcg ggcgcggatc tatgaatagg gaatgttgca 840
 ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggctcccaa gaacgttgaa aattcgtcca 900
 agagtgcctc caccgacagg aacactgaga ggagctcccg tgtcaatcac ttccattcct 960
 ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020
 tgttgtacct cacaagttac attaatttgc ttaccgtcag tgtctcgact cttgactacc 1080
 40 aaagcattat aaatataagg taacttgccc gggggaaaag tgacatccag cacgggtcca 1140
 ataattgat cgatacgccc tgtactttt tcttcaattg tagaaacccc gggacgagaa 1200
 gtataggat tgggtctcat aattatcaca taattttcaa aaaaaaggaa tttatcgaaa 1260
 ttttgatttt tttcttgttg aataatgcca aatcaacacc aaaaaaatat ccaaaaatcc 1320
 aaaagtcaaa aggaaatgaa ttagttaatt caataagaga gaaaagggga ccagcacttg 1380
 45 atttcgttgc ccaaacgaat ccattcaat cgtttactca tggaaatgagt ccgtcgga 1440
 gttcaatcaa tctttttttc atatacattt tgccctttgt aaacgatttg tgcctactct 1500
 actttcttat ctaggacttc gatatacaaa atatatacta ctgtgaagca tagattgctg 1560
 tcaacagaga attttcgtag tatttaggta tttccactca aaataagaaa agggggtcta 1620
 ttaagaactt aataaggatt agaagttgat ttggggttgc gctatatcta ttaaagagta 1680
 50 tacaataaag atggatttgg tgaatcaaat ccattggtta ataatcgaag catgttaact 1740
 tacaataaca acaactcaag tcgaatgaat tcctatagca tagaatgtac acagggtgta 1800
 cccattatat atgaatgaaa catattatat gaatgaaaca tattcattaa cttaagcatg 1860
 cccccattt tgtcgacggc ctttttggcc aagcttgata tcgaattccc ccgggctgct 1920
 ccccgccgt cgttcaatga gaatggataa gaggtcgtg ggattgacgt gagggggcag 1980
 55 ggatggctat atttctggga gcgaactccg ggcgaatacg aagcgcttgg atacagttgt 2040
 agggagggat ttcatcggtt aaactcgagg tcgacgggtat cgataagctt gatatcggt 2100
 aggaggaata aacaatgagc ccgaacgagc gcccgccga catccgccgt gccaccgag 2160
 cggacatgcc ggcggtctgc accatcgtca accactacat cgagacaagc acggtcaact 2220
 tccgtaccga gccgcaggaa ccgcaggagt ggacggacga cctcgctcgt ctgctgggagc 2280
 60 gctatccctg gctcgtcgcc gaggtggacg gcgaggtcgc cggcacgcgc tacgctggcc 2340
 cctggaaggc acgcaacgcc tacgactgga cggccgagtc gaccgtgtac gtctccccc 2400

gccaccagcg gacgggactg ggctccacgc tctacaccca cctgctgaag tccctggagg 2460
cacaggcgtt caagagcgtg gtcgctgtca tcggggtgcc caacgacccg agcgtgcgca 2520
tgcacgaggc gctcggatat gccccccgcg gcatgctgcg ggcgcccgcc ttcaagcacg 2580
5 ggaactggca tgacgtgggt ttctggcagc tggacttcag cctgccggtc ccgcccgtc 2640
cggtcctgcc cgtcacccag atctgatgac ccgggggagc ctgatatcaa gcttctcgag 2700
tgaacgcgta tagggcccaa ttogagctcg gtaccagcac caccagcggg gaggtgcgga 2760
acttctacaa cctcaaagcc cataacgttg cggatagaac ccttctcagg gtcaatcaga 2820
gcagcgtagt ttgctgcgtt cggcatcagt gctgccagaa tcgcagagta gctatctggg 2880
10 tcacagtaga acacacggtc agcagccgga acatagttct tggtcagagc cgcacgagcc 2940
ttagtacagag ccgcaataat ctccctaccc agcgcaactt ggtcgggtcaa gtgcggcctt 3000
gttctgagtg gtctcaatta cggtagcagt acctaagccc tcgggggagc tggggaggaa 3060
tgagatatga aaaagcctga actcaccgcg acgtctgtcg agaagtttct gatcgaaaag 3120
ttcgacagcg tctccgacct gatgcagctc tcggaggggcg aagaatctcg tgctttcagc 3180
15 ttcgatgtag gagggcgtgg atatgtcctg cgggtaaata gctgcgcgga tggtttctac 3240
aaagatcggt atgtttatcg gcacttttga tcggccgagc tcccgattcc ggaagtgtt 3300
gacattgggg agtttagcga gagcctgacc tattgcatct cccgccgtgc acagggtgtc 3360
acgttgcaag acctgcctga aaccgaactg cccgctgttc tacaaccggt cgcggagggt 3420
atggatgcga tcgctgcggc cgatcttagc cagacgagcg ggttcggccc attcggaccg 3480
caaggaatcg gtcaatacac tacatggcgt gatttcatat gcgcgattgc tgatcccat 3540
20 gtgtatcact ggcaaacgtg gatggacgac accgtcagtg cgtccgtcgc gcaggctctc 3600
gatgatcgta tgccttgggc cgaggactgc cccgaagtcc ggcaacctcg gcacgcggat 3660
ttcggctcca acaatgtcct gacggacaat ggccgcataa cagcggtcac tgactggagc 3720
gaggcgatgt tcggggattc ccaatacgag gtccgcaaca tcttcttctg gaggcggtg 3780
ttggcttgta tggagcagca gacgcgtac ttcgagcggg ggcattccgga gcttgcagga 3840
25 tcgccacgac tccgggcgta tatgtctcgc attggtcttg accaactcta tcagagcttg 3900
gttgacggca atttcgatga tgcagcttg gcgcaaggtc gatgcgagc aatcgccga 3960
tccggagccg ggactgtcgg gcgtacacaa atcgcccgca gaagcgcggc cgtctggacc 4020
gatggctgtg tagaagtact cgccgatagt ggaaaccgac gccccagcac tcgtccgagg 4080
gcaaagaaat agagtaggta ccagcaccac cagcggtgag gtgcggaact tctacaacct 4140
30 caaagcccat aacgttgccg atagaacctt tctcagggtc aatcagagca gcgtagtgtt 4200
ctgcgttcgg catcagtgtc gccagaatcg cagagttagc atctgggtca cagtagaaca 4260
cacggtcagc agccggaaca tagttcttgg tcagagccgc acgagcctta gtcagagccg 4320
caataatctc cttaccagc gcaacttggg cggtaagtgc ggccttgttc tgagtgggtc 4380
caattacggt agcagtacct aagccctcgg gggatcagct tggctgtttt ggcggatgag 4440
35 agaagatttt cagcctgata cagattaaat cagaacgcag aagcggctctg ataaaaaga 4500
atttccttgg cggcgtagc gcggtgttcc cacctgacct catgccgaac tcagaagtga 4560
aacgccgtag cgcgatggt agtgtggggg ctccccatgc gagagtaggg aactgccagg 4620
catcaaataa aacgaaaggc tcagtogaaa gactgggcct ttcgttttat ctgttggtt 4680
40 tcggtgaacg ctctcctgag taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa cgttgcgaag 4740
caacggcccg gaggttgccg ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca tcaaattaag 4800
cagaaggcca tcctgacgga ttggcctttt gcgtttctac aaactctttt tgtttatttt 4860
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctgg gggatcagct tgatggccgc cagtgtgatg 4920
gatgggaagt tcttattatt taggttagtc aggtatttcc atttcaaaaa aaaaaaagt 4980
45 aaaaaagaaa aattgggttg cgctatatat atgaaagagt atacaataat gatgtatttg 5040
gcaaatcaaa taccatggtc taataatcaa acattctgat tagttgataa ttcaaattgt 5100
gagcgtcac aatttgaaag attcctgtga aaagtctcat taacacggaa ttctgtctga 5160
gtagaccttg ttgttgtgag aattcttaat tcatgagttg tagggaggga tttatgtcac 5220
cacaacaga gactaaagca agtgttggat tcaaagctgg tgttaaagag tacaattga 5280
cttattatac tcctgagtac caaaccaagg atactgatat attggcagca tcccgagtaa 5340
50 ctctcaacc tggagttcca cctgaagaag caggggccgc ggtagctgcc gaatcttcta 5400
ctggtacatg gacaactgta tggaccgatg gacttaccag ccttgatcgt tacaaggggc 5460
gatgctaccg catcgagcgt gttgttgag aaaaagatca atatatgtc tatgtagctt 5520
accttttaga cttttttgaa gaagggtctg ttaccaacat gtttacttcc attgtaggta 5580
acgtatttgg gttcaaagcc ctgcgcgctc tacgtctgga agatctgcga atccctcctg 5640
55 cttatgttaa aactttccaa ggtccgcctc atgggatcca agttgaaaga gataaattga 5700
acaagtatgg tcgtcccttg ttgggatgta ctattaaacc taaattgggg ttatctgcta 5760
aaaactacgg tagagccgtt tatgaatgtc ttccggtggt acttgatttt actaaagatg 5820
atgagaacgt gaactcacia ccatattatgc gttggagaga tcgtttctta ttttgtgccg 5880
aagcacttta taaagcacag gctgaaacag gtgaaatcaa agggcattac ttgaatgcta 5940
60 ctgcaggtag atgcgaagaa atgatcaaaa gagctgtatt tgctagagaa ttgggcgttc 6000
cgatcgtaat gcatgactac ttaacggggg gattcaccgc aaatactagc ttggctcatt 6060

attgccgaga taatgggtcta cttcttcaca tccaccgtgc aatgcatgcg gttattgata 6120
 gacagaagaa tcatgggtatc cacttccggg tattagcaaa agcggtacgt atgtctgggtg 6180
 gagatcatat tcaactctggt accgtagtag gtaaacttga aggtgaaaga gacataactt 6240
 tgggctttgt tgatttactg cgtgatgatt ttgttgaaca agatcgaagt cgcggtatctt 6300
 5 atttcaactca agattgggtc tctttaccag gtgttctacc cgtggcttca ggaggtattc 6360
 acgtttggca tatgcctgct ctgaccgaga tctttgggga tgattccgta ctacagttcg 6420
 gtggaggaaac tttaggacat ccttggatct gcagctagtt ctaga 6465

10 <210> 26
 <211> 7057
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
 nucleotídica de un fragmento de ADN del vector
 pVTPA-Estrep entre los bordes atpB de arroz y rbcL
 de tabaco.

20 <400> 26
 gtcgaggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cgttgtaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
 gtttcataat gtctgttgcc aacgatccga ggttgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
 ggatctactg caggataaat ccttttgga gctaactctc tggaaagtac ggtagtagca 180
 25 tccaaatgtg caaatggtgt agcaggagca gggctcgtca aatcgtcgc aggtacataa 240
 accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
 cccatttctg tactaagagt aggttgataa cccactgcag agggcattct ccctaataag 360
 gcagatacct ccgatccctgc ttgaacaaaa cgaaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
 tcttgcttat taacatctcg gaaatattct gccatagtta gggcagtcaa accaactctc 480
 30 atacgagctc ctggcgggtc attcatttgg ccatagacta gagctacctt tgattcctca 540
 agattttttt cattaattac tccagattcc ttcatctcca tataaagatc atttccttca 600
 cgagtcctgt cccctactcc gccaaatacg gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
 ttgattaatt ccatgatgag tactgtttta cctactccag ctcccccaaa tagtccgatt 720
 tttcctccac gccgataagg agctaaaaga tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
 35 gataatttct tatctaaact gataaaggcg ggcgcggatc tatgaatagg gaatgttgca 840
 ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggctcccca gaacgttgaa aattcgtcca 900
 agagtagctc caccgacagg aacactgaga ggagctcccg tgtcaatcac ttccattcct 960
 ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020
 tgttgtacct cacaagttac attaatgtgc ttaccgtcag tgtctcgact cttgactacc 1080
 40 aaagcattat aaatataagg taacttgccc gggggaaaag tgacatccag cacgggtcca 1140
 ataatttgat cgatacgccc tgtacttttt tcttcaattg tagaaacccc gggacgagaa 1200
 gtagtaggat tggttctcat aattatcaca taattttcaa aaaaaaggaa tttatcgaaa 1260
 ttttgatttt tttctgtgtg aataatgcca aatcaacacc aaaaaatat ccaaaaatcc 1320
 aaaagtcaaa aggaaatgaa ttagttaatt caataagaga gaaaagggga ccagcacttg 1380
 45 atttcgttgc ccaaacgaat cccattcaat cgtttactca tggaatgagt ccgtcgaaa 1440
 gttcaatcaa tctttttttc atatacatct tgccttttgt aaacgatttg tgcctactct 1500
 actttcttat ctaggacttc gatatacaaa atatatacta ctgtgaagca tagattgctg 1560
 tcaacagaga attttcgtag tatttaggta tttccactca aaataagaaa agggggtcta 1620
 ttaagaactt aataaggatt agaagttgat ttggggttgc gctatatcta ttaagagta 1680
 50 tacaataaag atggatttgg tgaatcaaat ccatggttta ataatcgaag catgttaact 1740
 tacaataaca acaactcaag tcgaatgaat tcctatagca tagaatgtac acagggtgta 1800
 cccattatat atgaatgaaa catattatat gaatgaaaca tattcattaa cttaagcatg 1860
 cccccattt tgtcgacggt atcgataagc ttgatatcga attcaccttg gttgacacga 1920
 gtatataagt catgttatac tgttgaataa aaagccttcc attttgatta aataaaggag 1980
 55 gattttcata tgtatcgatt acgttaaggag gaataaacca tgattgctgg acctgagtgg 2040
 ctgctagacc gtccatctgt caacaacagc caattagttg tttagcgttg tggtactgtt 2100
 gaggggacga atcaagacat tagtcttaaa ttttttgaaa ttgacctaac atcacgacct 2160
 gctcatggag gaaagacaga gcaaggctta agtccaaaat caaaaccatt tgctactgat 2220
 agtggcgcg tgccacataa acttgaaaaa gctgacttac taaaggctat tcaagaacaa 2280
 60 ttgatcgcta acgtccacag taacgacgac tactttgagg tcattgattt tgcaagcgat 2340
 gcaaccatta ctgatcgaaa cggcaagggtc tactttgctg acaaagatgg ttcggtaacc 2400

	ttgccgaccc	aacctgtcca	agaatttttg	ctaagcggac	atgtgcgcgt	tagaccatat	2460
	aaagaaaaac	caatacaaaa	tcaagcgaac	tctgttgatg	tggaatatac	tgtacagttt	2520
	actcccttaa	accctgatga	cgattttcaga	ccagggtctca	aagatactaa	gctattgaaa	2580
	acactagcta	tcggtgacac	catcacatct	caagaattac	tagctcaagc	acaaagcatt	2640
5	ttaaacaaaa	cccaccagg	ctatacgatt	tatgaacgtg	actcctcaat	cgtcactcat	2700
	gacaatgaca	ttttccgtac	gatttttacca	atggatcaag	agtttactta	ccatgtcaaa	2760
	aatcgggaac	aagcttatga	gatcaataaa	aaatctgggtc	tgaatgaaga	aataaacaac	2820
	actgacctga	tctctgagaa	atattacgtc	cttaaaaaag	gggaaaagcc	gtatgatccc	2880
	tttgatacga	gtcacttgaa	actgttcacc	atcaaatacg	ttgatgtcaa	caccaacgaa	2940
10	ttgctaaaaa	cgagcgagct	cttaacagct	agcgaacgta	acttagactt	cagagattta	3000
	tacgatacct	gtgataaggc	taaactactc	tacaacaatc	tcgatgcttt	tggtattatg	3060
	gactatacct	taactggaac	agtagaggat	aatcacgatg	acaccaaccg	tatcataacc	3120
	gtttatatgg	gcaagcgacc	cgaaggagag	aatgctagct	atcatttagc	ctatgataaa	3180
	gatcggtata	ccgaagaaga	acgagaagtt	tacagctacc	tgcggttatac	agggacacct	3240
15	atacctgata	accctaacga	caaataaggga	tcctgatatac	aagcttctcg	agtgaacgag	3300
	tataggggccc	aattcgagct	cggtaccagc	accaccagcg	gtgaggtgag	gaacttctac	3360
	aacctcaaag	cccataacgt	tgcggataga	acccttctca	gggtcaatca	gagcagcgta	3420
	gtttgctgag	ttcggcacga	gtgctgccc	aatcgagag	tagctatctg	ggtcacagta	3480
	gaacacacgg	tcagcagccg	gaacatagtt	cttggtcaga	gccgcagcag	ccttagtcag	3540
20	agccgcaata	atctccttac	ccagcgcaac	ttggtcggtc	aagtgcggcc	ttgttctgag	3600
	tggtctcaat	tacggtagca	gtacctaaagc	cctcggggga	tctggggagg	aatgagatat	3660
	gaaaaagcct	gaactcaccg	cgacgtctgt	cgagaagttt	ctgatcgaaa	agttcgacag	3720
	cgtctccgac	ctgatgcagc	tctcgaggag	cgaagaatct	cgtgctttca	gcttcgatgt	3780
	aggaggggcgt	ggatatgtcc	tgcgggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	acaaagatcg	3840
25	ttatgtttat	cggcactttg	catcggcgcg	gtcccgattt	cgggaagtgc	ttgacattgg	3900
	ggagtttagc	gagagcctga	cctattgcat	ctcccgccgt	gcacaggggtg	tcacgttgca	3960
	agacctgcct	gaaaccgaac	tgcccgctgt	tctacaaccg	gtcgcgagg	ctatggatgc	4020
	gatcgctgag	gccgatctta	gccagacgag	cgggttcggc	ccattcggac	cgcaagggaat	4080
	cggatcaatac	actacatggc	gtgatttcat	atgcgcgatt	gctgatcccc	atgtgtatca	4140
30	ctggcaaaact	gtgatggacg	acaccgtcag	tgcgtccgtc	gcgcaggctc	tcgatgtact	4200
	gatgctttgg	gcccgaagat	gcccacctc	gtgcacgcgg	atttccggctc	atctccggctc	4260
	caacaatgtc	ctgacggaca	atggccgcat	aacagcggtc	attgactgga	gcgaggcgat	4320
	gttcgggggat	toccaatac	aggtcgccaa	catcttcttc	tgaggccgt	ggttggcttg	4380
	tatggagcag	cagacgcgct	acttcgagcg	gaggcatccg	gagcttgacg	gatcgccacg	4440
35	actccggggc	tatatgtctc	gcattgggtc	tgaccaactc	tatcagagct	tggttgacgg	4500
	caatttcgat	gatgcagctt	gggcgcagg	tcgatgcgac	gcaatcgtcc	gatccggagc	4560
	cgggactgtc	gggcgtacac	aaatcgcccg	cagaagcgcg	gccgtctgga	ccgatggctg	4620
	tgtagaagta	ctcgccgata	gtggaaccg	acgccccagc	actcgtccga	gggcaaaaga	4680
	atagagtagg	taccagcacc	accagcgggtg	aggtgcggaa	cttctacaac	ctcaaagccc	4740
40	ataacgtttg	ggatagaacc	cttctcagg	tcaatcagag	cagcgtagtt	tgctgcgttc	4800
	ggcatcagta	ctgccagaat	cgcaagtag	ctatctgggt	cacagtagaa	cacacgggtc	4860
	gcagccggaa	catagtctct	ggtcagagcc	gcacgagcct	tagtcagagc	cgcaataatc	4920
	tccttaccga	gcgcaacttg	gtcggttaagt	gcccgccttg	tctgagtggt	ctcaattacg	4980
	gtagcagtag	ctaagccctc	gggggatcag	cttggtctgt	ttggcggtatg	agagaagatt	5040
45	ttcagcctga	tacagattaa	atcagaacgc	agaagcgggtc	tgataaaaca	gaatttgcct	5100
	ggcggcagta	ggcggttggt	cccacctgac	cccatgccga	actcagaagt	gaaacgccgt	5160
	agcgccgatg	gtagtgtggg	gtctcccat	gcgagagtag	ggaactgcca	ggcatcaaat	5220
	aaaacgaaag	gctcagtcga	aagactgggc	ctttcgtttt	atctgttggt	tgctgggtgaa	5280
	cgctctcctg	agtaggacaa	atccgcggg	agcggatttg	aacgttgcca	agcaacggcc	5340
50	cggagggtgg	cgggcaggac	gcccgcata	aactgccagg	catcaaatta	agcagaaggc	5400
	catctgacg	gatggccttt	ttgctgttct	acaaactctt	ttgtttatt	tttctaaata	5460
	cattcaataa	tgtatccgct	gggggatcag	cttgatggcc	gccagtgtga	tggtgggaa	5520
	gttcttatta	tttaggttag	tcagggtatt	ccatttcaaa	aaaaaaaaa	gtaaaaaaga	5580
	aaaattgggt	tgcgctatat	atatgaaaga	gtatacaata	atgatgtatt	tggaataatca	5640
55	aataccatgg	tctaataatc	aaacattctg	attagttgat	aattcaaatt	gtgagcgctc	5700
	acaatttgaa	agattcctgt	gaaaagtctt	attacaacgg	aattcgtgtc	gagtagacct	5760
	tggtgttggt	agaattctta	attcatgagt	tgtagggagg	gatttatgtc	accacaaaca	5820
	gagactaaag	caagtgttgg	attcaaagct	ggtgttaaag	agtacaaatt	gacttattat	5880
	actcctgagt	accaaaccga	ggatactgat	atattggcag	cattccgagt	aactcctcaa	5940
60	cctggagttc	cacctgaaga	agcaggggac	gcggtagctg	ccgaatcttc	tactggtaca	6000
	tggacaactg	tatggaccga	tggacttacc	agccttgatc	gttacaagg	gcgatgtac	6060

cgcatcgagc gtgttggttg agaaaaagat caatatattg cttatgtagc ttacccttta 6120
gacctttttg aagaaggttc tgttaccaac atgtttactt ccattgtagg taacgtattt 6180
gggttcaaag ccctgcgcgc tctacgtctg gaagatctgc gaatccctcc tgcttatggt 6240
5 aaaactttcc aaggtcgcgc tcatgggagc caagttgaaa gagataaatt gaacaagtat 6300
ggtcgtcccc tgttgggatg tactattaaa cctaaattgg gggtatctgc taaaaactac 6360
ggtagagccg tttatgaatg tcttcgcggt ggacttgatt ttactaaaga tgatgagaac 6420
gtgaactcac aaccatttat gcgttggaga gatcgtttct tattttgtgc cgaagcactt 6480
tataaagcac aggctgaaac aggtgaaatc aaagggcatt acttgaatgc tactgcaggt 6540
acatgcgaag aaatgatcaa aagagctgta tttgctagag aattgggcgt tccgatcgta 6600
10 atgcatgact acttaacggg gggattcacc gcaaatacta gcttggctca ttattgccga 6660
gataatggtc tactttctca catccaccgt gcaatgcatg cggttattga tagacagaag 6720
aatcatggta tccacttccg ggtattagca aaagcgttac gtatgtctgg tggagatcat 6780
attcactctg gtaccgtagt aggtaaaactt gaaggtgaaa gagacataac tttgggcttt 6840
gttgatttac tgcgtgatga ttttgttgaa caagatcgaa gtcgcggtat ttatttcact 6900
15 caagattggg tctctttacc aggtgttcta cccgtggctt caggaggat tcacgtttgg 6960
catatgcctg ctctgaccga gatctttggg gatgattccg tactacagtt cggtggagga 7020
actttaggac atccttggat ctgcagctag ttctaga 7057

20